

PATENT COOPERATION TREATY

PCT
NOTIFICATION OF TRANSMITTAL
OF COPIES OF TRANSLATION
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio
 9th Floor
 Taka-ai Building
 15-2, Nihonbashi 3-chome
 Chuo-ku
 Tokyo 103-0027
 JAPON

JA903969

Date of mailing (day/month/year) 20 February 2002 (20.02.02)	
Applicant's or agent's file reference JA903969	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/04425	International filing date (day/month/year) 04 July 2000 (04.07.00)
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION et al	

1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP,CN,US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

AU,IN,KR

3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rul 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Eliott PERETTI Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

47
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference JA903969	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/04425	International filing date (day/month/year) 04 July 2000 (04.07.00)	Priority date (day/month/year) 05 July 1999 (05.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A01H 5/00, C12N 5/14, 15/52		
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION		

- This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
- This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.
☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of 1 sheets.

- This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 01 December 2000 (01.12.00)	Date of completion of this report 06 August 2001 (06.08.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04425

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages 1-24, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
 pages 2,3,6,8-11, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages 1,5,7, filed with the letter of 14 May 2001 (14.05.2001)
- ☒ the drawings:
 pages 1-24, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☒ the claims, Nos. 4
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04425

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-3,5-11	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-3,5-11	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-3,5-11	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Claims 1-11

Document 1 [Soil Sci. Plant Nutr., Vol. 43, (Special Edition), 1997, pp. 975-980] cited in the international search report describes the cloning of the cDNA of the *naat* gene that codes for nicotianamine aminotransferase (NAAT), an enzyme in the biosynthetic pathway of mugineic acids, which are induced by iron deficiency, in barley, and this examination does not recognize any particular difficulty in isolating the corresponding genomic gene based on this cDNA. Document 1 (see especially Introduction) suggests the creation of plants tolerant to iron deficiency by introducing genes from the mugineic acid regulatory pathway into plants, and this examination finds that persons skilled in the art can easily conceive of preparing a plant tolerant to iron deficiency by introducing the above gene together with a suitable promoter into rice.

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 1 月 11 日 (11.01.2001)

PCT

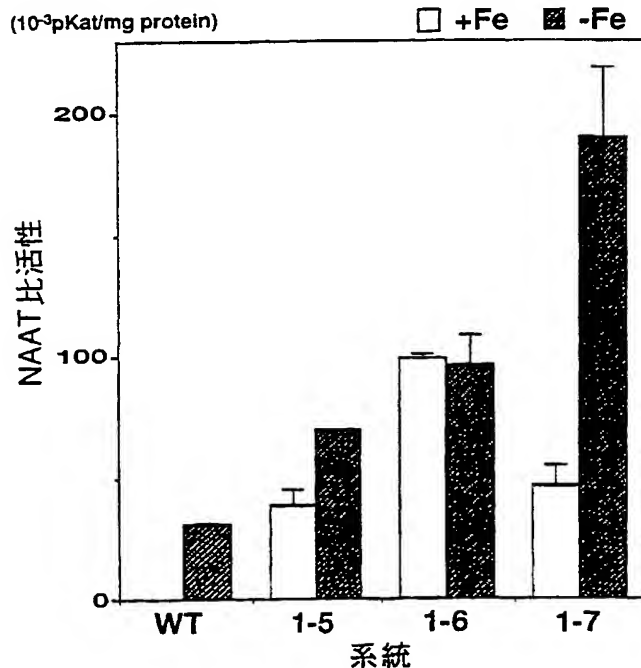
(10) 国際公開番号
WO 01/01762 A1

- (51) 国際特許分類: A01H 5/00, C12N 5/14, 15/52 CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/04425
- (22) 国際出願日: 2000 年 7 月 4 日 (04.07.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平11/190318 1999 年 7 月 5 日 (05.07.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 森 敏 (MORI, Satoshi) [JP/JP]; 〒113-0033 東京都文京区本郷5-32-2-206 Tokyo (JP). 中西啓仁 (NAKANISHI, Hiromi) [JP/JP]; 〒113-0022 東京都文京区千駄木5-32-20-308 Tokyo (JP). 高橋美智子 (TAKAHASHI, Michiko) [JP/JP]; 〒112-0006 東京都文京区小日向3-18-4 Tokyo (JP). 西澤直子 (NISHIZAWA, Naoko) [JP/JP]; 〒113-0001 東京都文京区白山1-37-9-705 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: CONSTRUCTION OF RICE TOLERANT TO IRON DEFICIENCY

(54) 発明の名称: 鉄欠之耐性イネの創製



a...SPECIFIC NAAT ACTIVITY
b...STRAIN

(57) Abstract: A gramineous plant having tolerance to iron deficiency which can grow even in an area with iron deficiency. More particularly, a gramineous plant having tolerance to iron deficiency and capable of vigorously growing even in calcareous alkaline soil which is constructed by transferring a gene of an enzyme in the pathway of the biosynthesis of mugineic acids in gramineous plants into a gramineous plant. A method of constructing a gramineous plant having improved iron absorbability which comprises transferring a gene encoding an enzyme (preferably nicotianamine aminotransferase; NAAT) in the pathway of the biosynthesis of mugineic acids into a gramineous plant; a gramineous plant constructed by the above method; a method of cultivating the above gramineous plant having improved iron absorbability; and a crop obtained by the cultivation. Namely, the construction of a novel gramineous plant having tolerance to iron deficiency.

[続葉有]

WO 01/01762 A1



(74) 代理人: 佐伯憲生(SAEKI, Norio); 〒103-0027 東京都
中央区日本橋三丁目15番2号 高愛ビル9階 Tokyo (JP). 添付公開 類:
— 国際調査報告

(81) 指定国 (国内): AU, CN, IN, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

本発明は、鉄欠乏地帯での生育が可能な鉄欠乏耐性を有するイネ科植物を提供する。より詳細には、本発明は、イネ科植物のムギネ酸類の生合成経路上の酵素の遺伝子をイネ科植物に導入することにより、石灰質アルカリ土壌などでも旺盛に生育する鉄欠乏耐性を有するイネ科植物を提供する。

本発明は、イネ科植物にムギネ酸類生合成経路中の酵素、好ましくはニコチアミンアミノ基転移酵素 (N A A T) をコードする遺伝子を導入して、鉄吸収性が改善されたイネ科植物を製造する方法に関する。また、本発明は前記した方法により製造され得るイネ科植物、前記鉄吸収性が改善されたイネ科植物を育成する方法及び当該育成により得られる作物に関する。即ち、本発明は鉄欠乏耐性を有する新規なイネ科植物の創製に関するものである。

明 細 書

鉄欠乏耐性イネの創製

技術分野

本発明は、鉄欠乏耐性を有するイネ科植物を製造する方法、その方法により得られたイネ科植物並びに当該イネ科植物を育成する方法及びその方法で得られた作物に関する。

より詳細には、本発明は、イネ科植物にムギネ酸類生合成経路中の酵素をコードする遺伝子、好ましくは当該酵素がニコチアミン・アミノ基転移酵素である遺伝子を導入して鉄欠乏耐性を有するイネ科植物の創製に関する。

背景技術

地球上の90%近くの土壌は、何らかの問題を抱える不良土壌であると言われている。不良土壌では一般的に、植物の生育に必須な元素を質的または量的に欠いているために植物の生育が阻害されたり、あるいは重金属等を多く含む土壌による生育障害などが起こる。不良土壌の代表として、乾燥地塩類集積土壌がある。これは、人為的な過剰灌漑や、長年にわたる乾燥気候により、土壌上層にNaClや Na_2CO_3 が集積したものと、 CaCO_3 や CaSO_4 が集積したものがある。ナトリウムの集積した土壌では、塩類濃度障害を引き起こし、石灰質の土壌では、鉄欠乏障害を引き起こす。

地球上の耕地土壌の約30%は、潜在的な鉄欠乏地帯と言われている(Wallence et al. 1960)。半乾燥地域の石灰質土壌では、毛管現象により母材から溶出した石灰質成分が地表に集積する。このような土壌では、pHが上昇しアルカリ性を示すため土壌中の鉄が $\text{Fe}(\text{OH})_3$ の形で存在し、溶解度が極めて低くなる。

このような土壌に生育した植物は、可溶性の鉄が少ないことにより、鉄欠乏クロロシスとなり、生育が阻害されるか、または枯死する。

高等植物の鉄獲得機構は、ストラテジー I (Strategy-I) とストラテジー II (Strategy-II) という2つに区分される。ストラテジー I は、イネ科を除く高等

植物の鉄獲得機構である。土壌中の三価の不溶態鉄を根の細胞表面に存在する三価鉄還元酵素により還元し、二価鉄のトランスポーターで吸収する機構である。この機構を有する植物の中には、根圏にプロトンを放出し、根圏のpHを下げることで三価鉄還元酵素の活性を増加させる機構を有しているものや、フェノール系化合物を根圏に放出し、形成されたFe(III)-フェノール系化合物キレートが細胞膜表面に存在する三価鉄還元酵素にFe(III)を供給する機構を持っているものが存在する。最近の研究で、シロイヌナズナの根に特異的に発現する二価鉄のトランスポーターIRT1(Eide et al. 1996)や、シロイヌナズナの三価鉄還元酵素の遺伝子が単離された(Robinson et al. 1997)。

ストラテジーIIは、単子葉植物の中のイネ科植物にのみ見られる鉄獲得機構である。イネ科植物は鉄欠乏条件下で、三価鉄キレート活性を有するムギネ酸類を根圏に放出し、「Fe(III)-ムギネ酸」錯体として根から鉄を吸収する(Takagi et al. 1984)。ムギネ酸類(MAs)は、ムギネ酸(MA)、2'-デオキシムギネ酸(DMA)、3-ヒドロキシムギネ酸(HMA)、3-エピヒドロキシムギネ酸(epiHMA)、アベニン酸(AVA)、ディスティコン酸、エピヒドロキシデオキシムギネ酸(epiHDMA)の7つが知られており、ムギネ酸類(MAs)は全て第1図に示すようにメチオニンを前駆体として合成される(Shojima et al. 1990, Ma et al. 1998)。

ムギネ酸の分泌には概日リズムが存在し(Takagi et al. 1984)、日の出後にその分泌量が最大となり、夜には分泌されなくなる。また、鉄欠乏のオオムギ根で分泌前に膨らんでいた顆粒が、分泌後にしぼむ現象が観察され(Nishizawa et al. 1987)、この顆粒内でムギネ酸が合成されていると考えられている。これらのことから、イネ科植物の鉄欠乏応答は、ムギネ酸合成のみならず、鉄欠乏シグナルの伝達、根の形態変化など複雑な制御系により成立していることが示唆される。

ムギネ酸合成経路に関わる酵素として、ニコチアナミン合成酵素の遺伝子が単離され、鉄欠乏により誘導されていることが報告された(Higuchi et al. 1999)。また、ニコチアナミンアミノ基転移酵素(NAAAT)の遺伝子が単離され、鉄欠乏により誘導されていた(Takahashi et al. 1997)。

また、鉄欠乏オオムギ根、コントロールのオオムギ根から抽出したmRNAを

用いたディファレンシャルスクリーニングにより、鉄欠乏条件下で特異的に誘導される遺伝子 *I d s 1*、*I d s 2*、*I d s 3* が単離された。*I d s 1* は、メタロチオネイン様タンパク質をコードする遺伝子である (Okumura et al. 1991)。*I d s 2* は、その遺伝子配列から予測されるアミノ酸配列が、水酸化酵素に相同性をもつ遺伝子であり (Okumura et al. 1994)、*I d s 3* もまた、その遺伝子配列から予測されるアミノ酸配列が、水酸化酵素に相同性をもつ遺伝子であった (Nakanishi et al. 1993)。エピヒドロキシムギネ酸合成経路には、水酸化反応が 2 カ所存在し、この遺伝子がこの反応を触媒する酵素をコードしているものと考えられている。

また、オオムギ根において鉄欠乏により誘導されるタンパク質として、*I D S 3* タンパク質、アデニンリボースリン酸転移酵素 (板井, 1999)、ギ酸脱水素酵素 (Suzuki et al. 1998)、そして 36 kDa タンパク質 (入船, 1991) などが挙げられる。イネ科植物は、鉄欠乏条件で、ムギネ酸を生合成するが、このとき根に含まれるメチオニンが減少するためにメチオニンサイクルでメチオニンを合成すると共に、生じたアデニンを AMP に変換するためにアデニンリボースリン酸転移酵素が誘導されていると考えられている (板井, 1999)。

ギ酸脱水素酵素は、メチオニンサイクルで生じたギ酸を分解する。また鉄欠乏のイネの根では、ミトコンドリアの形態変化と電子伝達系のエネルギーチャージの減少 (Mori et al. 1991) が報告されており、ギ酸脱水素酵素は、鉄欠乏により生じた嫌気条件により誘導され、エネルギー源としての NADH の供給をしているものと考えられている。

一方、人口の増加に伴って食糧の増産が今後の人類の生存の条件として大きな問題となってきた。イネは人類の古来からの重要な食糧のひとつであるが、鉄欠乏地帯でのイネの生育は難しいのが現状である。鉄欠乏地帯でイネの生育が可能となれば食糧の増産も可能となり、食糧増産の問題の解決策のひとつとして注目されている。

発明の開示

本発明は、鉄欠乏地帯での生育が可能な鉄欠乏耐性を有するイネ科植物を提供

することを目的としている。

より詳細には、本発明は、イネ科植物のムギネ酸類の生合成経路上の酵素の遺伝子をイネ科植物に導入することにより、石灰質アルカリ土壌などでも旺盛に生育する鉄欠乏耐性を有するイネ科植物を提供することを目的としている。

本発明は、イネ科植物にムギネ酸類生合成経路中の酵素をコードする遺伝子を導入して、鉄吸収性が改善されたイネ科植物を製造する方法、より詳細には、当該酵素がニコチアナミンアミノ基転移酵素（N A A T）であり、それをコードする遺伝子 *n a a t* を導入する鉄吸収性が改善されたイネ科植物を製造する方法に関する。

また、本発明は前記した方法により製造され得るイネ科植物に関する。より詳細には本発明は、イネ科植物にムギネ酸類生合成経路中の酵素をコードする遺伝子を導入してなる鉄吸収性が改善されたイネ科植物、さらに詳細には、当該酵素がニコチアナミンアミノ基転移酵素（N A A T）であり、それをコードする遺伝子 *n a a t* が導入されてなる鉄吸収性が改善されたイネ科植物に関する。

さらに、本発明は、前記鉄吸収性が改善されたイネ科植物を育成する方法及び当該育成により得られる作物に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、鉄欠乏オオムギ根のムギネ酸類生合成経路と根圏環境を図示したものである。

第2図は、*n a a t - A* の c D N A を挿入したイネ科形質転換用のバイナリーベクター p I G 1 2 1 H m の遺伝子の配列を示したものである。

第3図は、導入された遺伝子の検出をサザンハイブリダイゼーション法により行った結果を示す図面に代わる写真である。第3図の W T は野生種のイネの場合を示し、コントロールはベクターのみを導入した対照のイネの場合を示し、1-5、1-6、1-7、8-1 及び 15-2 は 35 S プロモーターを有する形質転換体を示す。

第4図は、鉄存在（+ F e）及び鉄欠乏（- F e）の水耕液で栽培した根にお

けるN A A Tの活性を測定した結果を示すものである。第4図の白抜き部分は+ F eの場合を示し、斜線部分は- F eの場合を示す。W Tは野生種のものを示し、1-5、1-6及び1-7は形質転換体のものを示す。

第5図は、アルカリ土壌に移植後8週目の各イネの生育状況を示す図面に代わる写真である。第5図のコントロール(control)は、ベクターのみを移植した対照のイネを示し、その右側のイネは形質転換したものである。

第6図は、アルカリ土壌移植後の各イネの草丈の変化をグラフにして示したものである。黒丸印は形質転換体15-2を示し、黒四角印は形質転換体8-1を示し、白丸印はコントロールとして用いたベクターのみを移植した対照のイネを示す。

第7図は、単離されたゲノム *n a a t* を含むファージDNAのひとつの制限酵素地図を示すものである。第7図中のEは *E c o R I* を、Hは *H i n d I I I* を、Bは *B a m H I* を、Nは *N o t I* をそれぞれ示す。両端の *N o t I* サイトは λ F I X I I のアームにある *N o t I* である。

第8図は、N A A Tゲノム断片を挿入したイネ科形質転換用のバイナリーベクターp B I G R Z 1の遺伝子の配列を示したものである。第8図のN P T I Iはカナマイシン耐性遺伝子を、H P Tはハイグロマイシン耐性遺伝子を、G U Sはイントロン入り β グルクロニダーゼ遺伝子を、L a c Zは β ガラクトシダーゼ遺伝子を、3 5 Pは3 5 Sプロモーターを、N PはN O Sプロモーターを、N TはN O Sターミネーターを、M C Sはマルチクローニングサイトを、R i o r iはR iプラスミド複製起点をそれぞれ示している。

第9図は、得られたゲノム *n a a t* の塩基配列を示した図である。

第10図は、得られたゲノム *n a a t* の塩基配列とcDNAと比較して決定した *n a a t* -Aと *n a a t* -Bの5'上流、エキソン、イントロン、3'下流を示した図である。第10図において大文字がcDNAに転写されていたエキソン部分を示し、小文字がそれ以外の部分を示している。

第11図は、得られたゲノム断片の模式図を示す。第11図中のEは *E c o R I* を、Hは *H i n d I I I* を、Bは *B a m H I* を示す。

第12図は、*n a a t* -A及び *n a a t* -BのcDNAにおけるイントロンの

挿入位置とイントロンのサイズを示したものである。

第13図は、cDNAから予想されるNAA T-Aのアミノ酸配列をアミノ酸の1文字表記で示したものである。

第14図は、cDNAから予想されるNAA T-Bのアミノ酸配列をアミノ酸の1文字表記で示したものである。

第15図は、ゲノム *n a a t* を導入したイネのアルカリ土壌に移植後10週間の生育の状況を示した図面に代わる写真である。第15図のコントロールは、ベクターのみを移植した対照のイネを示す。右側のイネはゲノム *n a a t* で形質転換したものである。

第16図は、ゲノム *n a a t* を導入したイネのアルカリ土壌移植後の草丈の変化をグラフにして示したものである。第16図の左側はゲノム *n a a t* で形質転換したイネであり、右側はベクターのみを移植した対照のイネである。

発明を実施するための最良の形態

単子葉植物の中のイネ科植物にのみ見られる鉄獲得機構である前記したストラテジー I I は、ムギネ酸類を生合成し、これを放出することにより鉄を獲得する方法であることから、ムギネ酸類の生合成経路（第1図参照）における酵素の強化方法について検討した。

本発明者らは、ムギネ酸合成経路上の酵素としてニコチアナミンアミノ基転移酵素（NAA T）にまず着目し、その遺伝子 *n a a t* を導入してみたところ、驚くべきことに、遺伝子が導入されたイネは石灰質アルカリ土壌でも旺盛に生育することを見出した。

ニコチアナミンアミノ基転移酵素（NAA T）の遺伝子 *n a a t* -A の cDNA を、p I G 1 2 1 H m に *X b a I* 及び *S a c I* 部位を使って組み込んで、第2図に示すバイナリーベクターを作成した。得られたベクターをアグロバクテリウムに導入し形質転換に用いた。

イネの形質転換はヒエイら（Hieiら（1994））の方法に従い、材料に「ツキノヒカリ」を用い、胚盤から誘導したカルスを前記した形質転換したアグロバクテリウム懸濁液に浸し感染させて、再生体（T1植物）を得、この種子から最終的

に 3 4 系統の形質転換イネを得た。

導入された遺伝子の検出をサザンハイブリダイゼーション法により行った。結果を第 3 図に示す。第 3 図の WT は野生種のイネの場合を示し、control はベクターのみを導入した対照のイネの場合を示し、1-5、1-6、1-7、8-1 及び 15-2 は 35S プロモーターを有する形質転換体を示す。第 3 図に示されるように形質転換体はいずれも *n a a t - A* を過剰発現していることがわかる。また、35S 形質転換イネのうち、8-1、15-2 には少なくともそれぞれ 5 コピー、2 コピーの *n a a t* が導入されたことが分かった。

遺伝子 *n a a t* を導入することにより、野生種やベクターのみを導入したものに比べてニコチアナミンアミノ基転移酵素 (N A A T) が過剰に発現され、その結果としてムギネ酸合成経路が活性化され、鉄の取り込みに必要とされるムギネ酸類が多量に産生されていることが推察される。

そこで、まずこれらの種の N A A T 活性を検討した。発芽後 3 週間の幼植物 (T 2) を鉄存在 (+ F e) 及び鉄欠乏 (- F e) の水耕液でそれぞれ 2 週間栽培し、それぞれの根における N A A T の活性を測定した結果を第 4 図に示す。第 4 図の白抜き部分は + F e の場合を示し、斜線部分は - F e の場合を示す。WT は野生種のものを示し、1-5、1-6 及び 1-7 は形質転換体のものを示す。

この結果、+ F e、- F e のいずれにおいても形質転換していない野生種 (W T) よりも形質転換したもののほうが比活性が高く、- F e の時さらに比活性が高くなることがわかった。このことは遺伝子の導入により、N A A T の活性が高くなることを示しているのみならず、形質転換体は鉄欠乏状態又は鉄の不溶態化した状態において N A A T 活性が非常に亢進されることを示している。即ち、鉄欠乏状態又は鉄の不溶態化した状態において強い耐性を有する種となっていることが推察された。

以上のことにより、遺伝子 *n a a t* を導入することにより N A A T 活性が亢進されることがわかったが、これらの形質転換体が実際の鉄欠乏土壌で生育できるかどうかを検討した。35S - *n a a t* - A 形質転換イネを鉄の不溶態化したアルカリ土壌に移植すると、移植後 2 週間目までは葉が黄化してくるが、その後の 4 ~ 5 週間目に新葉が濃い緑になり回復し始めた。第 5 図のアルカリ土壌に移植

後 8 週目の生育状況の写真を挙げる。第 5 図のコントロール (control) は、ベクターのみを移植した対照のイネを示し、その右側のイネは形質転換したものである。コントロールのものに比べて形質転換体のものの発育が格段に優れていることがわかる。また、アルカリ土壌移植後の草丈の変化を第 6 図に示す。第 6 図のグラフの縦軸は草丈 (cm) であり、横軸はアルカリ土壌移植後の日数 (日) を示す。黒丸印は形質転換体 15-2 を示し、黒四角印は形質転換体 8-1 を示し、白丸印はコントロールとして用いたベクターのみを移植した対照のイネを示す。

前述したように、35S 形質転換イネ 8-1 には少なくとも 5 コピーの *n a a t* 遺伝子が、また、35S 形質転換イネ 15-2 には少なくとも 2 コピーの *n a a t* 遺伝子が導入されており、第 6 図の草丈からみれば遺伝子のコピー数には余り関係無く、遺伝子が導入されていればイネに鉄欠乏耐性が付与できることが示されたことになる。

このように、イネのムギネ酸合成経路のなかの酵素の活性を、その遺伝子の導入により高めることができ、さらにそれにより鉄欠乏耐性が与えられることがわかった。

本発明のイネのムギネ酸合成経路のなかの酵素としては、第 1 図に示すムギネ酸類の生合成経路の中の酵素であって、当該酵素をコードする遺伝子を導入することによりその活性が高められるものであればよいが、前記したようにその中のニコチアナミンアミノ基転移酵素 (N A A T) やニコチアナミン合成酵素が好ましい。本発明のイネのムギネ酸合成経路のなかの酵素をコードする遺伝子としては、cDNA であってもゲノム由来のものであってもよい。後述するようにゲノムの使用も本発明の好ましい例である。

したがって、本発明のイネ科植物としては、ストラテジー I I の機構により鉄を吸収することが可能な植物であればよく、学術上のイネ科植物に限定されるものではない。本発明の好ましいイネ科植物の例としては、イネ、トウモロコシ、ソルガム、小麦、大麦、エンバクなどが挙げられる。これらのイネ科植物はその品種に関係なく、広く本発明の方法を適用することができ、目的とする遺伝子が導入されたイネ科植物を作出することができる。

本発明のプロモーターとしては、目的の酵素を発現させることができるもので

あれば特に制限はなく、35Sプロモーター、より具体的にはCaMV35Sプロモーターなどを用いることができる。

本発明のベクターとしては、形質転換において好適に使用することができるものであれば、特に制限はない。本発明の形質転換法としては、前記したアグロバクテリウムを用いる方法に限定されるものではなく、パーティクルガンなどを用いた各種の形質転換法を採用することもできる。また、形質転換されるイネ科植物の細胞としては、前記したカルスからの細胞に限定されるものではなく、各種の細胞を使用することもできるが、通常はカルス由来のものが好ましい。

本発明の鉄欠乏とは、鉄分が欠乏している状態であってもよいが、好ましくは植物が吸収することができる状態の鉄分が欠乏している状態であり、植物の種類に応じて鉄欠乏状態であるか否かを決めることもできる。したがって、本発明における鉄欠乏耐性とは、目的とする植物がその土壌においては鉄分を吸収するのが困難な状態に対する耐性であるということもできる。

次に本発明者らは、*n a a t*のcDNAに代えてオオムギのゲノム*n a a t*の導入を試みた。

ゲノム*n a a t*は、オオムギ(*Hordeum vulgare* L. var. Igri)より抽出したゲノムDNAを用いて作成されたライブラリー (SRTRATAGENE社製) を用いた。このライブラリーは、制限酵素 *S a u 3 A I* で部分的に切断され、 λ *F I X I I* ベクターの *X h o I* サイトに導入されたものである。プローブとしては、先に単離した *n a a t*-A cDNAの全長を用いた。ホストとしては、大腸菌 *X L 1* - *B l u e* MRA (*E. coli* *X L 1*-Blue MRA (P2)) を使用した。

スクリーニングの結果、5つのファージが得られ、これらについてそれぞれファージDNAの単離を行い、それぞれについて制限酵素地図を作製したところ、すべて同じ断片を含むことが解った。すなわち、得られた5つのファージは同じゲノムの部分から由来するものであることが解った。また、これらはプローブに使用した *n a a t* を含むことが予想された。そこで、第7図に示すこのうちの1つについて塩基配列の決定を行った。

第7図に示したファージDNAを、10kb以上の断片を挿入でき、かつアグロバクテリウムを用いたイネの形質転換を行うことのできるプラスミドベクター

p B I G R Z 1 の *N o t I* サイトに挿入した（第 8 図参照）。

さらに、第 7 図に示した断片について 11.0 kb までを、A～D までの 4 つに分け、これらをプラスミドベクター p B l u e s c r i p t S K (-) の *E c o R I* サイト（B、C）、または *N o t I*、*E c o R I* サイト（A、D）に導入した。

A～D の各断片についてプラスミド上の配列を元にしたプライマー（M13 フォワードプライマー、M13 リバースプライマー）にて断片の両端から塩基配列を決定した。塩基配列の決定には島津製作所社製 DNA シーケンサー D S Q - 2 0 0 0 L を使用した。

配列決定の詳細は後述する実施例に記載されている。

決定した 10,966 bp の塩基配列を配列表の配列番号 1 示す。また、全配列を第 9 図（塩基番号なし）に示した。

得られた塩基配列から、この 10,966 bp の遺伝子は、これまで得られていた *n a a t - A* と *n a a t - B* をコードするオオムギゲノムの断片であることがわかった。順序は *n a a t - B*、*n a a t - A* の順であった。

第 10 図に c D N A と比較して決定した *n a a t - A* と *n a a t - B* の 5' 上流、エキソン、イントロン、3' 下流を示した。第 10 図において大文字が c D N A に転写されていたエキソン部分を示し、小文字がそれ以外の部分を示している。エキソン部分の塩基番号はそれぞれ以下になる。

この模式図を、第 11 図に示した。エキソン部分を斜線で塗った部分で示している。両遺伝子ともに 6 つのイントロン、7 つのエキソンで形成されている。また、イントロンの挿入位置は、各遺伝子ともに相同の位置であった。c D N A のどの位置にどの大きさのイントロンが挿入されているかを第 12 図に示した。

c D N A から予想される *n a a t - A* 及び *n a a t - B* のアミノ酸配列を第 13 図及び第 14 図にそれぞれ示した。

得られたオオムギのゲノム *n a a t* を導入したイネの形質転換法は、前述した 35S の形質転換イネの形質転換法に準じて行った。

次に得られたゲノム *n a a t* を導入したイネの鉄欠乏耐性の検定を行った。得られた再生体（T1）のうち 39 個体とベクターのみを導入したコントロール

(control) 15 個体を用いて 35S の形質転換植物と同様に検定を行った。移植後 5 週目から、1 週間または 2 週間ごとに草丈の測定を行った。4 - 5 週間ごとに 2 回土壌サイズを増やしたポットに移し変えた。

ゲノム *n a a t* で形質転換されたイネは、アルカリ土壌に移植後 2 週間目までに葉が黄化し 4 ~ 5 週間目に新葉が濃い緑になり回復し始め、俄然旺盛な生育を示すようになった。これに対してベクターのみを入れた対照区は永く黄化葉が続き、8 週目あたりから新葉の緑化が始まった。

第 15 図は、アルカリ土壌に移植後 10 週間目の生育の状況を示した写真である。

第 15 図の control は、ベクターのみを移植した対照のイネを示す。右側のイネはゲノム *n a a t* で形質転換したものである。

アルカリ土壌移植後の草丈の変化を第 16 図に示す。第 16 図のグラフの縦軸は草丈 (cm) であり、横軸はアルカリ土壌移植後の日数 (日) を示す。第 16 図の左側はゲノム *n a a t* で形質転換したイネであり、右側はベクターのみを移植した対照のイネである。

これにより、ゲノム *n a a t* の導入によりイネに鉄欠乏耐性が付与できたことがわかった。

実施例

次に、具体例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの具体例に限定されるものではない。

実施例 1 : CaMV 35S プロモーターで *n a a t* を過剰発現するイネの形質転換法

第 2 図に示すバイナリーベクターを、遺伝子 *n a a t* の cDNA を pIG121Hm に *Xba*I 及び *Sac*I 部位を使って組み込んで作成した。これをアグロバクテリウムに導入し形質転換に用いた。

イネの形質転換はヒエイら (Hiei, et al., (1994)) の方法に従い、材料には「ツキノヒカリ」を用いた。まず、籾を取り除いた種子を滅菌して、N6 無機塩

N 6 ビタミン 30 g/L、スクロース (sucrose) 2 mg/L、2, 4-D 2 g/L、ゲルライト (gelrite) からなるカルス誘導培地 (pH 5.8) に播種し、 $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ で、16 時間明期/8 時間暗期の条件で 25℃、3 週間培養して胚盤からカルスを誘導した。

新しい培地に移し、25℃明所で3日間培養した後、アグロバクテリウム懸濁培地 (pH 5.8) (AA 無機塩 アミノ酸 B 5 ビタミン 20 g/L、スクロース (sucrose) 2 mg/L、2, 4-D 0.2 mg/L、カイネチン (kinetin) 10 mg/L アセトシリンゴン (acetosyringone)) でアグロバクテリウム懸濁液に浸し、ペーパータオルで水を切った後、共存培養培地 (pH 5.2) (N 6 無機塩 N 6 ビタミン 30 g/L、スクロース (sucrose) 10 g/L、グルコース (glucose) 2 mg/L、2, 4-D 10 mg/L アセトシリンゴン (acetosyringone) 2 g/L、ゲルライト (gelrite)) で 28℃暗黒下で3日間感染させた。

その後、500 mg/L でクラフォランを入れた滅菌水洗浄液でカルスを洗ってアグロバクテリウムを除去し、50 mg/L のハイグロマイシンを含む選抜培地 (pH 5.8) (N 6 無機塩 N 6 ビタミン 30 g/L、スクロース (sucrose) 2 mg/L、2, 4-D 2 g/L、ゲルライト (gelrite) 500 mg/L、クラフォラン 50 mg/L、ハイグロマイシン (hygromycin)) 上に置床して25℃明所で3週間培養した。

培養後、再分化培地 (pH 5.8) (MS 無機塩 MS ビタミン 30 g/L、スクロース (sucrose) 30 g/L、ソルビトール (sorbitol) 2 g/L、カザミノ酸類 (casamino acids) 1 mg/L、NAA 2 mg/L、BAP 500 mg/L、クラフォラン 50 mg/L、ハイグロマイシン (hygromycin)

4 g/L、ゲルライト (gelrite)) に移し3~5週間で再分化してきた再生体 (T1 植物) を検定培地に移した。検定培地 (pH 5.8) は、MS 無機塩 MS ビタミン 30 g/L、スクロース (sucrose) 50 mg/L、ハイグロマイシン (hygromycin) 8 g/L、寒天 (agar) からなっている。

シャーレー杯に大きくなった植物体を4~5日間馴化させた後、合成培土 (ボンソル1号、住友化学) とバーミキュライトを1:1にまぜた土に移植して種子

をとった。最終的に 3 4 系統の形質転換イネを得た。

実施例 2 : 導入された遺伝子のサザンハイブリダイゼーション法による検出

実施例 1 で得られた T 1 植物の葉を磨碎し、C-TAB 法の改変によりゲノムを抽出した。抽出したゲノムを *HindIII* で処理し、0.8% アガロースゲルを用いた電気泳動で分離した。これをナイロンメンブレンにブロッティングした。プローブに *n a a t* の内部配列で作成したプライマーを用いて PCR によって ^{32}P でラベルしたものをを用いてハイブリダイゼーションを行った後、BAS 2000 (フジフィルム) によってバンドを検出した。

このサザンハイブリダイゼーションの結果を第 3 図に示す。第 3 図の WT は野生型のイネの場合を示し、control はベクターのみを導入した対照のイネの場合を示し、1-5、1-6、1-7、8-1 及び 15-2 は 35S プロモーターで *n a a t*-A を過剰発現するイネの場合を示す。

第 3 図に示す結果より、35S 形質転換イネのうち、8-1、15-2 には少なくともそれぞれ 5 コピー、2 コピーの *n a a t* が導入されたことが分かった。

実施例 3 : アルカリ土壌を用いた鉄欠乏耐性の検定

供試土壌として、次の構成成分からなる貝化石土壌を用いた。

構成成分 (%) ; 水分	0.48
リン酸全量	0.12
カリ全量	0.12
ケイ酸全量	22.79
石灰全量	37.82
苦土全量	0.91
マンガン全量	0.018
ホウ素全量	0.003
アルカリ分	38.80
塩酸不溶解物	28.88

酸化鉄	0.99
酸化アルミニウム	5.59
亜鉛	0.002

この土壌の可溶性の鉄濃度は 2.2 ppm であり、 pH は 8.78 であり、電気抵抗は $0.03 \text{ m}\Omega$ であった。

35S の形質転換植物の検定には、最初に得られた形質転換植物の再生体 (T1) の種子を 50 mg/L のハイグロマイシンを含む MS 固形培地上に播種して選抜、馴化後、 $20 \sim 25 \text{ cm}$ になった幼植物 (T2) を用いた。

34 系統のうちの 16 系統 27 種について耐性の検定を行った。検定法はプラスチックの黒ポット (0.5 L) の底にペーパータオルとろ紙を円形に切ってしき、アルカリ土壌を入れたものに植物を移植し、水耕液 (春日井氏液; $7 \times 10^{-4} \text{ M}$ K_2PO_4 , $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ KCl , $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ KH_2PO_4 , $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ MgSO_4 , $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ H_3BO_3 , $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ MnSO_4 , $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ ZnSO_4 , $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ CuSO_4 , $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ $(\text{NH}_4)_3\text{MO}_4$, $1.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ Fe-EDTA) をポットの底から $2 \sim 3 \text{ cm}$ 浸し、昼 30°C 、夜 25°C の温室で栽培した。アルカリ土壌は $3 \sim 4$ 週間後にポットのサイズを 1 L にし、 $8 \sim 9$ 週間後に 2 L と一回りづつ大きくして植え替えた。移植後 2 週目から、1 週間または 2 週間ごとに草丈の測定を行った。

+Fe (鉄存在) 又は -Fe (鉄欠乏) の水耕液で育てた形質転換イネ (35S-naat イネ) の NAAT 比活性の測定を次のようにして行った。発芽後 3 週間の幼植物 (T2) を +Fe、-Fe の水耕液で 2 週間栽培しそれぞれの根における NAAT 活性を測定した。その結果を第 4 図に示す。第 4 図の白抜き部分は +Fe の場合を示し、斜線部分は -Fe の場合を示す。WT は野生種のもの示し、1-5、1-6 及び 1-7 は形質転換体のものを示す。

+Fe、-Fe のいずれにおいても形質転換していない野生種 (WT) よりも形質転換したもののほうが比活性が高く、-Fe の時さらに比活性が上乘せされた (第 4 図参照)。

実施例 4 : アルカリ土壌による鉄欠乏耐性の検定

35S-natat-A 形質転換イネをアルカリ土壌に移植して、その生育を観察した。

35S-natat-A 形質転換イネは、移植後 2 週間目までに葉が黄化し 4 ~ 5 週間目に新葉が濃い緑になり回復し始め、natat の導入によりイネに鉄欠乏耐性が付与できたことがわかった。

移植後 8 週目の生育状況の写真を第 5 図に示す。第 5 図の control は、ベクターのみを移植した対照のイネを示す。右側のイネは形質転換したものである。

アルカリ土壌移植後の草丈の変化を第 6 図に示す。第 6 図のグラフの縦軸は草丈 (cm) であり、横軸はアルカリ土壌移植後の日数 (日) を示す。黒丸印は形質転換体 15-2 を示し、黒四角印は形質転換体 8-1 を示し、白丸印は control として用いたベクターのみを移植した対照のイネを示す。

遺伝子 natat の導入によりイネに鉄欠乏耐性が付与できたことがわかった (第 5 図、第 6 図)。

実施例 5 : natat-A 及び B ゲノミッククローンの単離

スクリーニングの手順は主に「クローニングとシーケンス」(農村文化社)によった。

ライブラリーとして、ストラタジーン (STRATAGENE) 社より購入した λ FIX II ライブラリーを用いた。これはオオムギ (Hordeum vulgare L. var. Igri) より抽出したゲノム DNA を用いて作成されたものである。ゲノム DNA は、制限酵素 *Sau3A* I で部分的に切断され、λ FIX II ベクターの *Xho* I サイトに導入されたものである。ライブラリーのインサートサイズは 9 ~ 23 kb である。

(1) NZCYM 液体培地 (NZ アミン 10 g、NaCl 5 g、カザミノ酸 1 g、バクトイースト抽出物 (Bacto-yeast extract) 5 g、MgSO₄ · 7H₂O 2 g、及び、1N NaOH 約 6 mL を蒸留水で 1 L にし (pH 7.

5) オートクレーブで殺菌したもの。)で一晩培養した大腸菌 (*E. coli* XL1-Blue MRA (P2)) を遠心した後、10 mM $MgSO_4$ 溶液 20 mL に懸濁した。

(2) この大腸菌懸濁液 100 mL とファージ希釈液 (スクリーニング用プレート (9 cm x 13 cm) に 25,000 プラークを形成する量) 100 mL とを混ぜ、37℃ 20 分静置後、8 mL の 50℃ 0.7% トッパアガー (100 mL あたり 0.7 g のアガロースを加えたもの) と混ぜ、スクリーニング用プレート (9 cm x 13 cm) にまいた。プレートは 37℃ に静置し、プラークのサイズが 0.5 mm になるまで培養した。

(3) ナイロンメンブレン Hybond-N (Amersham 社) をプレートのサイズに切り取り、トッパアガロースの上に 30 秒間おいた。これを変性液 (0.5 M NaOH、1.5 M NaCl) を含ませた濾紙の上にプラークと接触した面を上にして置いた。2 枚目のメンブレンをトッパアガロース上に置き、1 分間放置した。同様に変性液をしみこませた濾紙上においた。5 分間放置した後、2 枚のメンブレンを中和液 (0.5 M Tris-HCl pH 8.0、1.5 M NaCl) をしみこませた濾紙上に移した。5 分間放置後、2 x SSPE (0.02 M NaH_2PO_4 pH 7.4、0.3 M NaCl、2 mM EDTA) 液で 2 回よく洗い、乾燥させた。

(4) 先に単離した *naaA*-A の cDNA 全長をプローブとして使用するために、プラスミドベクター pYH23 の *HindIII* 及び *NotI* サイトに入っているものを同サイトで切り出し、精製した。これをランダムプライマー DNA ラベリングキット第 2 版 (Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2 (宝酒造)) を用いて [α - ^{32}P] dATP でラベル化した。

一方、メンブレンを予め 65℃ に加温しておいた 30 mL のハイブリダイゼーションバッファー (6 x SSPE、5 x デンハルト溶液、0.1% SDS、100 mg/mL 変性サケ精巢 DNA) でプレハイブリダイゼーションを 65℃ で 1 時間行い、ハイブリダイゼーションバッファーを交換した (25 mL)。

これに、前記で調製したプローブを加え、65℃ で 12 時間ハイブリダイゼーションを行った。メンブレンの洗浄は予め 65℃ に加温しておいた洗浄液 (5 x

SSPE) で 65℃ で 10 分間を 2 回、ハイストリージェント (high stringency) 洗浄液 (2 x SSPE, 0.1% SDS) 65℃ で 1 回を行った。メンブレンをサランラップで包み、イメージングプレート (フジフィルム) に一晩感光させ、イメージングアナライザー (フジフィルム) で結果を得た。

試薬は、20 x SSPE (0.2 M NaH_2PO_4 , pH 7.4, 3 M NaCl, 20 mM EDTA)、50 x デンハルト溶液、5 g フィコール 400、5 g ポリビニルピロリドン (MW 360,000)、5 g 仔ウシ血清アルブミンを 500 mL の蒸留水に溶解し、0.45 mm のフィルターで濾過したものを使用した。

(5) 二枚のメンブレンに共通して現れたものをポジティブとして、この場所に対応するブランクを元のシャーレから打ち抜いた。打ち抜いたものは SM 液 (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 M NaCl, 7 mM MgSO_4 , 0.01% ゼラチン) にとり、4℃ で保存した。その後、このファージ液を使って同様に 2 次、3 次スクリーニングを行った。最終的に 5 つのファージが得られた。

上記で得られた 5 つのファージについてそれぞれファージ DNA の単離を行った。それぞれについて制限酵素地図を作製したところ、すべて同じ断片を含むことが解った。すなわち、得られた 5 つのファージは同じゲノムの部分から由来するものであることが解った。また、これらはブローブに使用した *naat* を含むことが予想された。そこで、このうちの 1 つ (第 7 図参照) について塩基配列の決定を行うこととした。第 7 図中の E は *EcoRI* を、H は *HindIII* を、B は *BamHI* を、N は *NotI* をそれぞれ示す。両端の *NotI* サイトは λ FIXII のアームにある *NotI* である。

実施例 6 : サブクローニングと塩基配列の決定

(1) 第 7 図に示したファージ DNA を、10 kb 以上の断片を挿入でき、かつアグロバクテリウムを用いたイネの形質転換を行うことのできるプラスミドベクター pBIGRZ1 に挿入した。第 7 図で示したファージ DNA ののはじめの *NotI* サイトから 11.0 kb にある *NotI* サイトまでの断片 11.0 kb

p を切り出し、p B I G R Z 1 の *N o t I* サイトに挿入した（第 8 図参照）。第 8 図の *N P T I I* はカナマイシン耐性遺伝子を、*H P T* はハイグロマイシン耐性遺伝子を、*G U S* はイントロン入り β グルクロニダーゼ遺伝子を、*L a c Z* は β ガラクトシダーゼ遺伝子を、*3 5 P* は *3 5 S* プロモーターを、*N P* は *N O S* プロモーターを、*N T* は *N O S* ターミネーターを、*M C S* はマルチクローニングサイトを、*R i o r i* は *R i* プラスミド複製起点をそれぞれ示している。

すなわち、塩基配列の決定を行ったのは、この 11.0 kb についてである。後のイネの形質転換にはこの作成したコンストラクトを使用した。

(2) p B I G R Z 1 は大腸菌 (*E. c o l i* X L 1 - b l u e) 内で安定に保持される。このコンストラクトを持った大腸菌を培養し、ここからプラスミドをプラスミド調整器 *P I - 5 0 α* (倉敷紡績株式会社) により抽出した。

(3) 第 7 図に示した断片について 11.0 kb までを、A ~ D までの 4 つに分け、これらをプラスミドベクター p B l u e s c r i p t S K (-) の *E c o R I* サイト (B、C)、または *N o t I*、*E c o R I* サイト (A、D) に導入した。

(4) A ~ D の各断片についてプラスミド上の配列を元にしたプライマー (M 1 3 フォワードプライマー、M 1 3 リバースプライマー) にて断片の両端から塩基配列を決定した。塩基配列の決定には島津製作所社製 DNA シーケンサー D S Q - 2 0 0 0 L を使用した。

(5) 各断片について塩基配列の決定された部分からさらに先を読むためのプライマーとそこまで読めた配列を逆方向から確認するためのプライマーを作成し、順次塩基配列を決定した。最終的には全ての断片について、5' 方向からと 3' 方向から両方向について配列決定を行った。各断片の塩基配列を決定するのに使用したプライマーの配列を以下に示す。

これらのプライマーは、D S Q - 2 0 0 0 L での使用のため 5' 末端にフルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate, F I T C) でラベルした。

断片 A 用のプライマー

名称:配列 F-A1F: FITC-5'-gct act agt agt att cct ggt gta g
名称:配列 F-A1R: FITC-5'-gga gta cta cta gac tac acc agg a
名称:配列 F-A2F: FITC-5'-aca tgc gca tgc atg aat tgc cg
名称:配列 F-A2R: FITC-5'-caa ttc atg cat gcg cat gtc cc

断片B用のプライマー

名称:配列 F-B1F: FITC-5'-ggt caa gta tgc agt atg ttg gaa c
名称:配列 F-B1R: FITC-5'-gtt cca aca tac tgc ata ctt gac c
名称:配列 F-B2F: FITC-5'-cta gaa gcc tat gga tgt ttc ttt tgg
名称:配列 F-B2R: FITC-5'-cca aaa gaa aca tcc ata ggc ttc tag
名称:配列 F-B3F: FITC-5'-agt tct tat caa ttt ccg aga tga c
名称:配列 F-B3R: FITC-5'-ata gtc atc tcg gaa att gat aag a
名称:配列 F-B4F: FITC-5'-agt ggt cac cat gcg gac caa cac c
名称:配列 F-B4R: FITC-5'-ggt gtt ggt ccg cat ggt gac cac t

断片C用のプライマー

名称:配列 F-C1F: FITC-5'-cac cgg cca gtt caa ctg cta cgc
名称:配列 F-C1R: FITC-5'-gcg tag cag ttg aac tgg ccg gtg
名称:配列 F-C2F: FITC-5'-ttt gga gga gat cca tga cga cat a
名称:配列 F-C2R: FITC-5'-tat gtc gtc atg gat ctc ctc caa a
名称:配列 F-C3F: FITC-5'-tct tct cat atg cta ctg tgg gga t
名称:配列 F-C3R: FITC-5'-tga cat gca aca cag gga cat gag c

断片D用のプライマー

名称:配列 F-D1F: FITC-5'-cat gct gac gaa gag cga ggt cat a
名称:配列 F-D1R: FITC-5'-ccc agg ata tga cct tag tgg ttg g

(6) 上で完全に配列決定ができなかった部分について新たに下に示すプライマーを合成し、パーキンエルマージャパン社製自動DNAシーケンサーABI PRIS

MTM 310 genetic Analyzerを使用して、完全に塩基配列を決定した。

断片 B 用のプライマー

名称:配列 B5F: 5'-gaa tgg caa act ggg tcc gca tta c

名称:配列 B5R: 5'-gta atg cgg acc cag ttt gcc att c

名称:配列 B6F: 5'-ctg gtt gtt gtg gcc tgg acg aaa c

名称:配列 B6R: 5'-gtt tct tcc agg cca caa caa cca g

名称:配列 B7F: 5'-agc aca aac cct acc tat gtt agg c

名称:配列 B7R: 5'-gcc taa cat agg tag ggt ttg tgc t

断片 C 用のプライマー

名称:配列 C4F: 5'-tgg aat ttc gcc cgg ggc aag gac

名称:配列 C4R: 5'-ccc tgt gac aag tgc tct gct acg

名称:配列 C5F: 5'-tct ggg atc tca gtg cat cca aca

名称:配列 C5R: 5'-gaa gca tat atc agt caa aca taa cc

また、断片 A と断片 B、断片 B と断片 C のつなぎ目部分を確定するために以下のプライマーを作成して、(1) で作成したコンストラクトをパーキンエルマー・ジャパン社製自動 DNA シーケンサー ABI PRISM MTM 310 genetic Analyzer を使用して、塩基配列を決定した。

断片 A と断片 B の境目

名称:配列 A-eF: 5'-cac atc ctt tgc ctt gct gaa tat gg

名称:配列 B-tR: 5'-cag tag tac taa tta atc acc tta gta gc

断片 B と断片 C の境目

名称:配列 B-eF: 5'-cac gat caa cca aag aat gtc ctc c

名称:配列 C-tR: 5'-tac ttg tat atg cag ctc cag cac

(7) 決定した 10,966 bp の塩基配列を配列表の配列番号 1 示す。また、全配列を第 9 図 (塩基番号なし) に示した。

得られた塩基配列から、この 10,966 bp の遺伝子は、これまで得られていた *n a a t - A* と *n a a t - B* をコードするオオムギゲノムの断片であることがわかった。順序は *n a a t - B*、*n a a t - A* の順であった。

第 10 図に cDNA と比較して決定した *n a a t - A* と *n a a t - B* の 5' 上流、エキソン、イントロン、3' 下流を示した。第 10 図において大文字が cDNA に転写されていたエキソン部分を示し、小文字がそれ以外の部分を示している。エキソン部分の塩基番号はそれぞれ以下になる。

<i>n a a t - B</i>	第 1 エキソン	5 7 9 - 1 2 9 9	(開始コドン	6 5 1 8)
	第 2 エキソン	1 4 8 3 - 1 8 2 5		
	第 3 エキソン	1 9 2 2 - 2 1 4 0		
	第 4 エキソン	2 2 4 4 - 2 3 0 3		
	第 5 エキソン	2 7 6 1 - 2 9 1 6		
	第 6 エキソン	3 2 6 3 - 3 3 5 6		
	第 7 エキソン	3 7 3 5 - 4 0 3 3	(終始コドン	3 8 6 8)

<i>n a a t - A</i>	第 1 エキソン	6 4 5 7 - 6 8 9 7	(開始コドン	6 5 1 8)
	第 2 エキソン	7 0 2 9 - 7 3 7 1		
	第 3 エキソン	7 4 7 9 - 7 6 9 7		
	第 4 エキソン	7 7 8 4 - 7 8 4 3		
	第 5 エキソン	8 2 8 5 - 8 4 4 0		
	第 6 エキソン	8 7 3 8 - 8 8 3 1		
	第 7 エキソン	9 4 1 4 - 9 7 3 2	(終始コドン	9 5 4 7)

この模式図を、第 11 図に示した。エキソン部分を斜線で塗った部分で示している。両遺伝子ともに 6 つのイントロン、7 つのエキソンで形成されている。また、イントロンの挿入位置は、各遺伝子ともに相同の位置であった。cDNA の

どの位置にどの大きさのイントロンが挿入されているかを第 1 2 図に示した。

c D N A から予想される *n a a t - A* 及び *n a a t - B* のアミノ酸配列を第 1 3 図及び第 1 4 図にそれぞれ示した。

実施例 7 : オオムギのゲノム *n a a t* を導入したイネの形質転換法

前記した実施例 6 で得られたオオムギのゲノム *n a a t* を導入したイネの形質転換法は、以下に示す (1) ~ (3) の点を除いては 3 5 S の形質転換イネのときと同様に形質転換を行った。

(1) カルス誘導を 2 8 °C 暗所で行い、カルス誘導培地を、

N 6 無機塩 N 6 ビタミン 0 . 3 g / L、カザミノ酸 (casamino acid) 3 0 g / L、スクロース (sucrose) 2 m g / L、2 , 4 - D 2 . 8 g / L、プロリン 4 g / L、ゲルライト (gelrite) (p H 5 . 8) とした。

(2) アグロバクテリウムによる感染を 2 5 °C で行い、共存培養培地を、

N 6 無機塩 N 6 ビタミン 3 0 g / L、スクロース (sucrose) 1 0 g / L、グルコース (glucose) 1 g / L、カザミノ酸 (casamino acid) 2 m g / L、2 , 4 - D 2 0 m g / L、アセトシリンゴン (acetosyringone) 2 g / L、ゲルライト (gelrite) (p H 5 . 2) とし、ろ紙を敷いて行った。

(3) 選抜は、はじめの 1 週間を 1 0 m g / L、次の 1 週間を 3 0 μ g / L、最後の 2 週間を 5 0 m g / L のハイグロマイシンを含む選抜培地を使い、暗所 2 8 °C で培養した。

選抜培地として、N 6 無機塩 N 6 ビタミン 1 g / L、カザミノ酸 (casamino acid)、3 0 g / L スクロース (sucrose)、2 m g / L 2 , 4 - D、2 5 0 m g / L クラフォラン、1 0 - 5 0 m g / L ハイグロマイシン (hygromycin)、2 g / L ゲルライト (gelrite) (p H 5 . 8) を用い、

再分化培地として、M S 無機塩 M S ビタミン 3 0 g / L スクロース (sucrose)、3 0 g / L ソルビトール (sorbitol)、2 g / L カザミノ酸 (casamino acid)、1 . 1 g / L M E S、2 m g / L N A A、1 m g / L カイネチン (kinetin)、2 5 0 m g / L クラフォラン、5 0 m g / L ハイグロマイシン (hygromycin)、4 g / L ゲルライト (gelrite) (p H 5 . 8) を用い、

28℃で培養を行った。

実施例8：ゲノム *n a a t* を導入したイネの鉄欠乏耐性の検定

ゲノム *n a a t* を導入したイネの鉄欠乏耐性の検定は、得られた再生体 (T1) のうち39個体とベクターのみを導入したコントロール (control) 15個体を用いて35Sの形質転換植物と同様に検定を行った。移植後5週目から、1週間または2週間ごとに草丈の測定を行った。4-5週間ごとに2回土壌サイズを増やしたポットに移し変えた。

ゲノム *n a a t* で形質転換されたイネは、アルカリ土壌に移植後2週間目までに葉が黄化し4~5週間目に新葉が濃い緑になり回復し始め、俄然旺盛な生育を示すようになった。これに対してベクターのみを入れた対照区は永く黄化葉が続き、8週目あたりから新葉の緑化が始まった。これにより *n a a t* の導入によりイネに鉄欠乏耐性が付与できたことがわかった (第15図及び第16図参照)。

第15図は、アルカリ土壌に移植後10週間目の生育の状況を示した写真である。

第15図の *c o n t r o l* は、ベクターのみを移植した対照のイネを示す。右側のイネはゲノム *n a a t* で形質転換したものである。

アルカリ土壌移植後の草丈の変化を第16図に示す。第16図のグラフの縦軸は草丈 (cm) であり、横軸はアルカリ土壌移植後の日数 (日) を示す。第16図の左側はゲノム *n a a t* で形質転換したイネであり、右側はベクターのみを移植した対照のイネである。

これにより、ゲノム *n a a t* の導入によりイネに鉄欠乏耐性が付与できたことがわかった。

産業上の利用可能性

本発明は、鉄欠乏耐性を有する新規なイネ科植物を提供するものであり、鉄欠乏耕地においても生育可能な新規なイネ科植物を提供するものである。

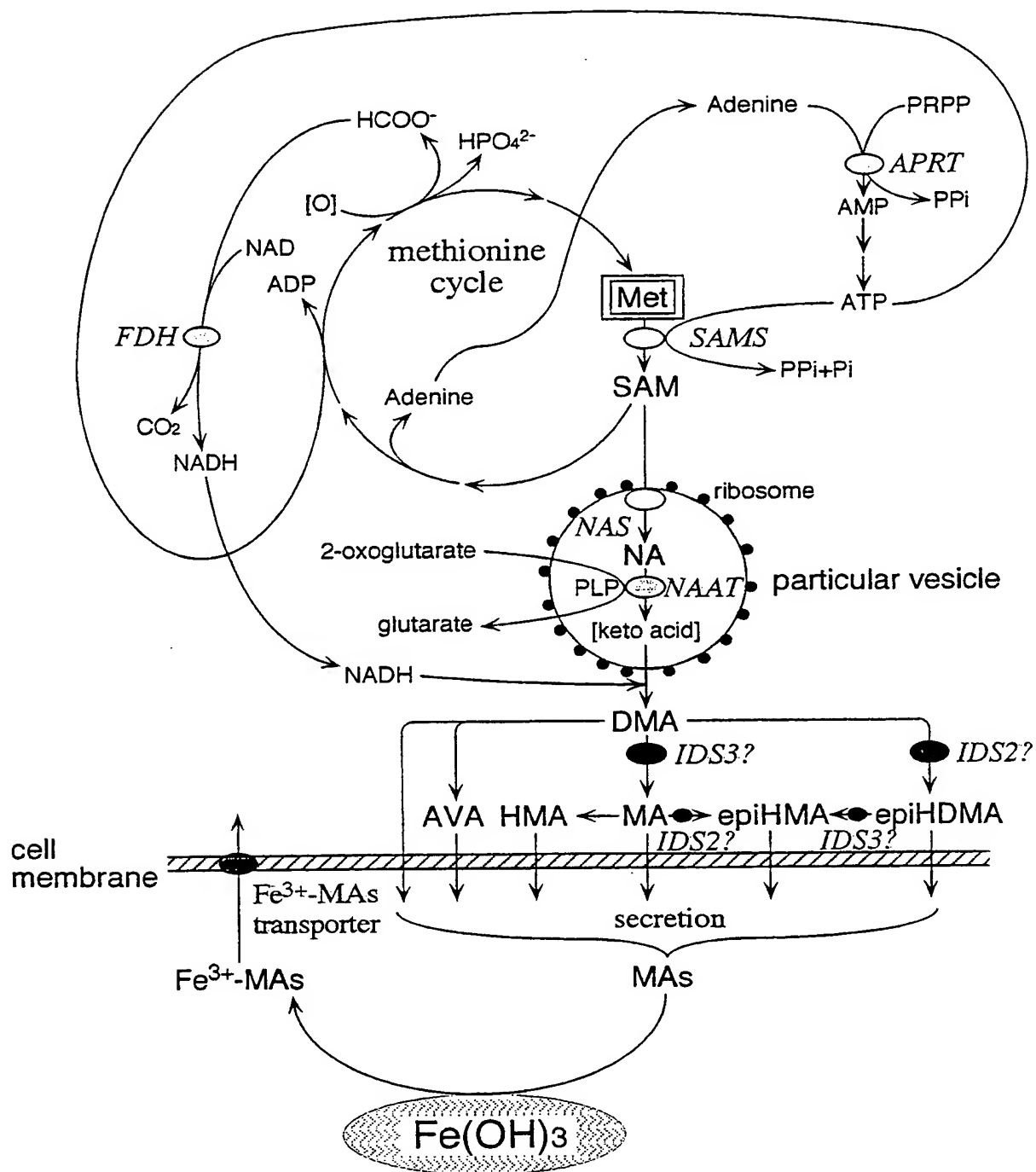
また、本発明は、イネ科植物に、ムギネ酸類生合成経路中の酵素をコードする遺伝子を導入することにより、鉄吸収性が改善されたイネ科植物をえることがで

きるという新規な知見を提供するものである。

請 求 の 範 囲

1. イネ科植物にムギネ酸類生合成経路中の酵素をコードする遺伝子を導入して、鉄吸収性が改善されたイネ科植物を作出する方法。
2. 酵素がニコチアナミンアミノ基転移酵素（N A A T）であり、それをコードする遺伝子が *n a a t* である請求の範囲第 1 項に記載の方法。
3. プロモーターが C a M V 3 5 S である請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載の方法。
4. 導入される遺伝子がゲノム遺伝子である請求の範囲第 1 項～第 3 項のいずれかに記載の方法。
5. ゲノムがオオムギのゲノム *n a a t* である請求の範囲第 4 項に記載の方法。
6. 遺伝子の塩基配列が、配列表の配列番号 1 で示される塩基配列、若しくは当該塩基配列にストリージェントな条件でハイブリダイズ可能でかつニコチアナミンアミノ基転移酵素（N A A T）活性を有する蛋白質を発現し得る塩基配列、又はそれらに相補的な塩基配列である請求の範囲第 5 項に記載の方法。
7. 請求の範囲第 1 項～第 6 項のいずれかの方法で製造され得る鉄欠乏耐性を有するイネ科植物。
8. 請求の範囲第 7 項に記載のイネ科植物の種子。
9. 請求の範囲第 7 項に記載のイネ科植物の細胞。
10. 請求の範囲第 7 項に記載のイネ科植物を鉄欠乏耕地で育成する方法。
11. 請求の範囲第 10 項に記載の方法により得られたイネ科植物の作物。

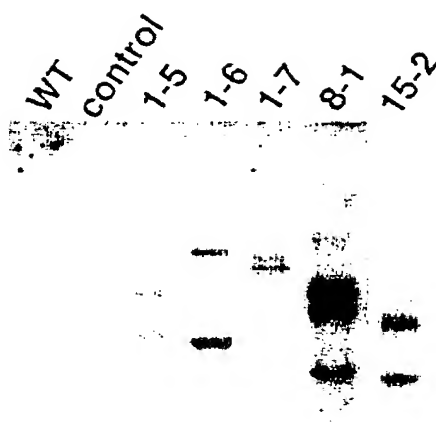
第 1 図



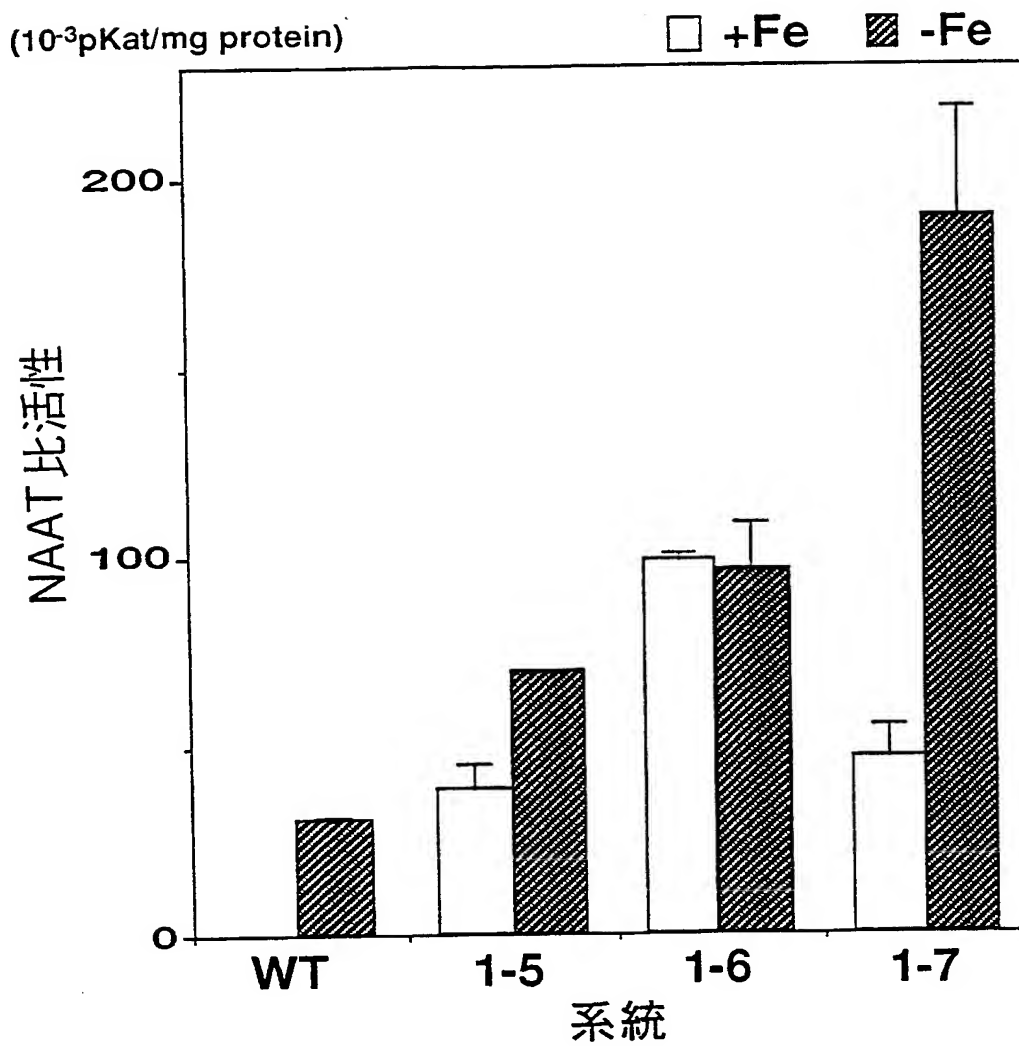
第 2 図



第 3 図



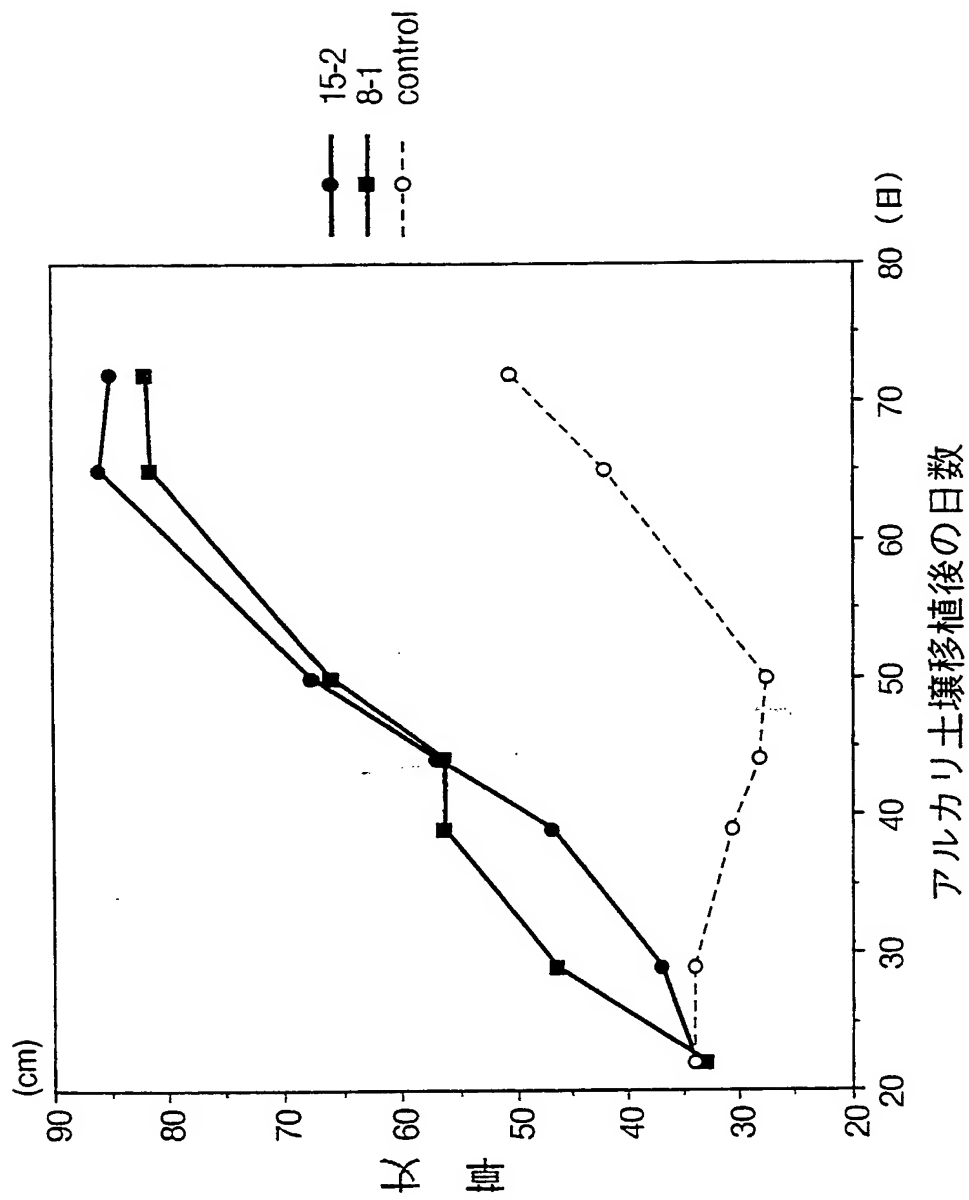
第 4 図



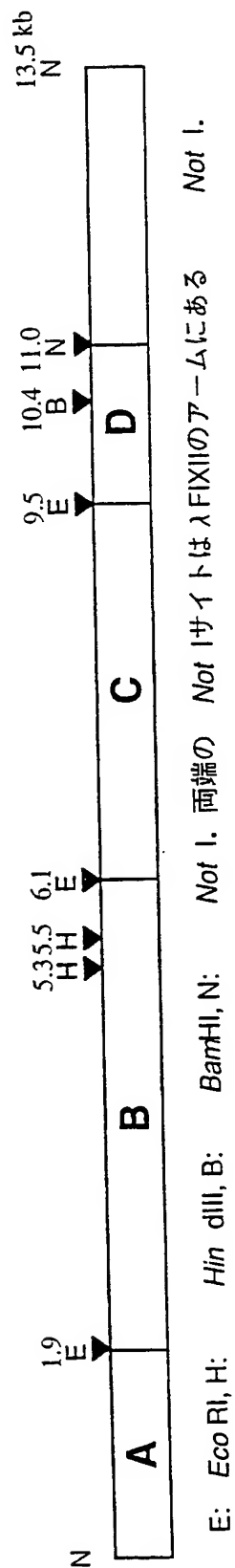
第 5 図



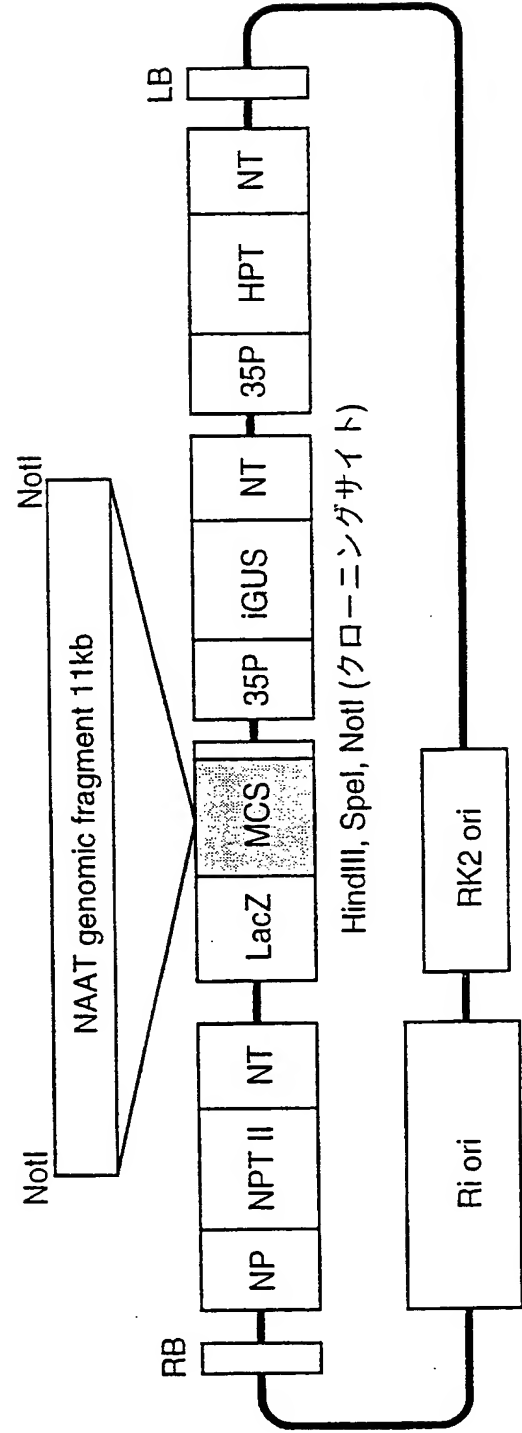
第 6 図



第 7 図



第 8 図



第 9 回

CTCGATCCCATTGCAATGGTATGATTAGCTATCAAACGAAAGAGATGGCATGTGCC
CTGTGTGTCATCCCTCACTGGCTTGGCGAATGGCGATACCGAGTTAGGTAGAGTGTTTTT
TTAGCATGATGTCTGCCGGCACTGCCAAGAAACTGCGTGCAGCGGACTGCAGGAGAGTT
GAGCGATGCATGCTTTGTGATGAGCGGAGCTGAGTGGGTGTCACTAACTGAACCCAATCA
GCATTGGGTGAGTCGAGTCGAGAAGCATCATGCTTCCTGCGTCCCGATCCGCTTATCTTT
TTCTCCCAAATTATTAAAGAGGGATAGATGATGGTGTGCTGGGTGGGTAGAGTACGTGC
ATAGAACCAAAGCGAGGCGCCGAAAATATGCCGGGGATAATGGTGGCAGGCCCGCAACGGC
CACGCCCCTCAGCTGGCAGCGCGTGCAGAGCGTGCCAGAGCGTGCGCGCGTGCCTGCT
TCTTGCTGCCGGCCCCGGTTTCGTGTGCGGTGAGAGCAACGGCTATATAGGACCGTCAATC
ACCGCTACTCAATCCGTCCCCAACTCGTTTCCTATTACCGCTACTAGTAGTATTCTTGCT
GTAGTCTAGTAGTACTCCTCCTCCTCCTTCTCCTCCTACCCGTTTCCTCATGGCCACCGT
ACGCCAGAGCGACGGAGTCGCCCGGAACGGCCTTGCCGTGGCCGCAGCCGCGAACGGCAA
GAGCAACGGCCATGGCGTGGCTGCCGCCGTGAACGGCAAGAGCAACGGCCATGGCGTGGA
TGCCGACGCGAACGGCAAGAGCAACGGCCATGGCGTGGCTGCCGACGCGAACGGCAAGAG
CAACGGCCATGCCGAGGCCACTGCGAACGGCCACGGCGAGGCCACTGCGAACGGCAAGAC
CAACGGCCACCGCGAGAGCAACGGCCATGCTGAGGCCGCCGACGCGAACGGCGAGAGCAA
CGAGCATGCCGAGGACTCCGCGGCGAACGGCGAGAGCAACGGGCATGCGGCGGCGGCGGC
AGAGGAGGAGGAGGCGGTGGAGTGGAATTTGCGGGTGCCAAGGACGGCGTGTGCGGCG
GACGGGGGCGAACATGAGCATCCGGGCGATACGGTACAAGATCAGCGCGAGCGTGCAGGA
GAAGGGGCGCGGCCCGTGTGCTGCCGCTGGGCCACGGGGACCCGTCCGTGTTCCCGGCCTT
CCGCACGGCCGTGAGGCCGAGGACGCCGTGCGCCGCCGCGTGCACCCGGCCAGTTCAA
CTGCTACCCCCGCCGCGTGGCCCTCCCCGCCGCACGAAGGTAACAACAACAACAACAA
GAACAATTTCTTTTCGCGTGTGCTGTGCGCGCGCAATCCATGCATGCGCATGTGCCGCT
TTCACGTGTCCGTCCGTCCGTCCACCGTTTCCTTCCTCCTCCTACGCCCATGAGAAATCT
GACCTTCTCCACCTTATACCAAACAAAACAAAAAACACAGCGCCGTGGCAGAGCACCT
GTCGCAGGGCGTGCCGTACATGCTATCGGCCGACGACGTCTTCCTCACCGCCGGCGGGAC
CCAGGCGATCGAGGTATAATCCCGGTGCTGGCCCAGACCGCCGGCGCCAACATTTCTGCT
CCCCAGGCCAGGCTACCCAAACTACGAGGCGCGCGCCGCGTTCAACAGGCTGGAGGTCCG
GCATTTTCGACCTCATCCCCGACAAGGGGTGGGAGATCGACATCGACTCGCTGGAATCCAT
CGCCGACAAGAACCACCGCCATGGTCATCATAAACCCCAACAACCCGTGCGGCAGCGT
TTACTCCTACGACCATCTGTCCAAGGTTTCACATCCTTTGCCTTGCTGAATATGGATTCA
GTTACAGTGCACCTGCTGAATTCTTTTTTGCCAATCGCATACTGACTGATGTTGCTCAATTA
GGTTCGCGGAGGTGGCGAAAAGGCTCGGAATATTGGTGATTGCTGACGAGGTATACGGCAA
GCTGGTTCTGGGCAGCGCCCCGTTTCATCCCAATGGGAGTGTTTTGGGCACATCACCCCTGT
GCTGTCCATAGGGTCTCTGTCCAAGTCATGGATAGTGCCTGGATGGCGGCTTGATGGGT
AGCGGTGTACGACCCAGAAAGATCTTACAGGAACTAAGGTACTTAAATCTCTATATCA
TTCTTTTCAAATGCTACTAAGGTGATTAATTAGTACTACTGTACAATATATTTGCTAAAT
TTGTACTGACATTTTTGTGGTAGATCTCTACATCAATTACGAATTACCTCAATGTCTCGA
CAGACCCAGCAACCTTCATTACAGGTCAGTCTTTGGTATTTACCTCGTTTCAAGAAATAAA
GTCTTTGGTATTTACTCCTCCTTGTCTTATTTTGCTCCGGTCCCTATGTTGTAGGCAGCC
CACGTGCATGTCAAGTGACCGTTTTTTTACATTAAAGTTTGAAAGTCAAAGTCAGACACAT
ACACTTGTAGTTATTTTACCTTTGTTTGCTTTGATCCGATAAAATAAAAAATACAAAA
CTGAACCTACTGTTGAATATAACCACTGTTCTTACAAGATATACATGATTGCACTATGGG
CATGCCATATTCTTTTGGGTCAAGTATGCAGTATGTTGGAACCTCTTTTGAATAATAGAT
ACATTGTACTATGAGTATACCATTTTATTAAGAATTCATATTTTGATATCCTTGATGGT
ATTGTTCTCTTGATTCACACGATTTACTTGTGGTTTTTTGTACTATCAAATTGTTTCAG
GCAGCTCTTCTCAGATTCTTGAGAACACAAAGGAAGATTTCTTTAAGGCGATTATTGGT
CTGCTAAAGGAATCATCAGAGATATGCTACAAACAAATAAAGGAAAACAAATACATTACA
TGTCCTCACAAGCCAGAAGGATCAATGTTTGTGTCATGGTAAGCCTATTTTGTGAAGTAAAA
AAATCTTAGGGAGTGTGAGTAATCATAAACTTATTTATATAGGATTAATCTGGGACCGAA

ATGCATCCAACATAATTACTTCAAATTCAAATTCAAATTACATTCTTCCGTACATATTTT
TGAAGATGCATGTATTTTAAGAATAATGACGAGAGCTAAAGTTATGCTACGACTAATCAT
CTGGATATCCTTTGTCCATCTTTTGTGTATACTGTGGAATGTTAATGGTCAAATCATATT
ACACAAATATCCATGCTAGTTTCTAGAAAGATTGATTATTTTCTGTAACCATGAACTCC
GTATTAACCTCCATGTAAACAGGTGAACTGAACTTACATCTTTTGGAGGAAATAGACGA
TGACATTGATTTTTTGCTGCAAGCTCGCAAAAGAAGAATCAGTAATCTTATGCCCAGGTAG
GAATCCATTGTTGATTTTTGACTGTATATGAAGTTCTTATCAATTTCCGAGATGACTATA
CATATAAATGATTACCATATTATGGTCAGAAATTGTATAACAGTGTTAGAATATTCTGTG
AAGACTTTTTTAACACAATATTCTGTGAAGACTAGATATCATGTACTTCTCCTTGTTTTTC
TTGACCTGATGTCCTTCGTCACATGTTGTGCTCCTCACAAAAAATAGCAAGCACATGTT
TCAAATAATTGTTAATAATATAATTTAGCCTTTAATTTATATGGTTCTATTTTGAGATAT
TTTTGTAGTCCAACCTTATATATTTGTGACTATTCTCAAAAAACAAAACCTTATATATGTGTG
CCTCTCAAATGTAGGGAGTGTTCTTGGAATGGCAAACCTGGGTCCGCATTACTTTTGCTTG
TGTTCCATCTTCTCTTCAAGATGGTCTCGGAAGGATCAAATCATTCTGTCAAAGGAACAA
GAAGAGAAATTCGAGCGATGATTGCTAGTTGTATATCTGACTGAAGCTGTAAATCATTCC
CAGTATCCCCATCTATATCTTTCAATAAAATGGAACTTTGTAGTTCTCTATGAATAGAAGT
CAACATCTCCTTGAATATGTTCTGGTTGTTGTGGCCTGGACGAAACATAGTGAATGTTAT
GTTAGTGAAGTTACATTGGCGTCGAAGATCTTTGAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGGGGG
GGGGGGGGGGTGCTTTGATATTACTCTTAAGTACACGTTCTCTCAAGTTATGTCAAAGCA
CTTTGTAAACAATTGTAGATTTGGTATCATGATATGGATTAAACTAGTCAGATACTTGGT
AAGCACAAACCCTACCTATGTTAGGCTCACTAAGGTGGCGTTTGGTTCGAGAGAGAGGAA
GGATCAGTTGATGATATCCCCAATCATCGAAGTAAATCATGTGTTGTTGCTACCCTTTT
CTACAATCCTAGTAGCTGCATGCGTTGAGCTACTGATCAACACCCTGCACAACCATATT
CTCTGTGCAAAATCGGCACCCAAAGATTACATCTCACAGCTGAAGCAACCACCAAAATTTG
AAGAGAGGAACCCTCACAAAGACCTTTGAGTGGCCCCCACAATGCATGGTTAGGCCGCCG
TCGCAGGCCGGAGTGGTCACCATGCGGACCAACACCAACTCCAACGGGGGAGCACGTCAC
CGATTACTGAAATTCCCCAAAACAATTCTTAATTTGTGAACAAAATTTAAAACAGGAACA
ATTTTTGAATTTGTGAACAAATTTTTTAAACGGGTATTCCTGAACATTTTTTCAAATTTGT
GATCAAATTTTTAAAACGACTTCTTTCTCAAATTTGAGCAATATTTAAAATTATAAAAAA
GTTCAACAATTTTGAACTTTTTAAAATTAGCGGAGAACATTTTGAAATTTCTAAATATTTT
CGAATTTGGAACATTTTTTCTATTTCTGAACAAAAATGAAAATACGAACGTAATTTGGA
ATAAATTTTTGGAATGCGATTTTTTTGAAATTTCTGAACATATTTTGAAAAACAAAAAA
CTTTAAAAGGTAAAATAAAAAATAAAATAAAATAGAAACATAAAAAATAAGCAAAAAATA
AAAGAAATCCGAGAAAAGCCAACTGGGAATAGCACATGGAAAAACCCAGCCGTCCGCCG
ACTGTGTAAAGCTATAAGTGAGCCGGCCCCAAGCCTCGTCGTCTCATACACCTGTGCGA
AACCCCGACAATTCGTTGCACTATGCGGCGAATAGGCTTTTCCAGGAGCTCCTGTCTTCC
GGTTATGGGTCAATTTGCACACCCCTCCTCCACTTGGGCCAGGCTATTATACTTTTTTCC
TTCTTTTCGACCTCACGTTACTACGCCAGTTTAGTTTTTGGAAAGCGACCAACCGGTTTTGT
GAAGGTTCTAGAAACTCAACCATTTTTTGGGAAGCTTCTAGAAGCCTATGAATGTTTCTTT
TGGACATGTATTATTTGTGTTTTTTCTTTTTCAAATTCGACAACTTTTTTCAAATTCAT
GATTTTTGTGAACTTGTGATTTTTTGAATCCGTGATTTTTTTTCCATAATCCGTGTTTT
GAAAAAACTGTGGACTTTTCCGAAATTAATGAACATTTGTTTGCAAGATCGATGATCCT
TTTCAAATGAGCGATTTTTTTCTAAAATATCCACATATTTTTTCATATTCATAAGCTTTCC
TTTTAATCGTGAACATCTTAGCATTTGGTGAACTTTATTAATTTTCTTTATAAAATGA
TTTTTTTTCAAAGCCAACGGTTAACGGTTGACCGCTGAACCACAACCACAAACCGGGGA
AACCATTGACTCGCTGAACAGGGCAGGGCTTTCATATGATTGGGTGGTCTAATACCAGCG
CCCCTGACTACTAAACGAAGGAATTGCAATTTTACCAACCCTACTATGGTAAAAAATG
AATATCACGATAAAAAAGGGGAAAAAAACTATACCCTGAAAATCCCTCTGTTTCTAAAT
ATTTGTTGTTGGGGGAGTAATACTATTACACGATCAACCAAAGAATGTCTCTCAAGAAAA
ACCCAAAGAAAGTGCTAGAGTTTTGTTTTCAAGGACCGAAAGATAGAGATAGCATTCTGA
ATTAGGTCCATCTTTTTCCCAAGGATTGAAAGAAAGAGATAGAATTCTGAATTAGGTGCG

GAGATATCATTTCTGGATTAGGTACAATTGTTTTGCCGGCACAGCCAAACCCCGCAGTGG
AGCCGGAATTGGAATTGAGTGGGTGGAGTCGAGAAGCATGGTTCATGCGTTCTCAAAGAG
TGTAGCCAGTAGTGTGTGCTCCTTGGTGCTGGAGCTGCATATACAAGTACATAAAACAAA
GACGATCAGCTGGCAGCGTGCTGCATGCGTGCTTCTTGCTGCCGCCCGGAAGCCCCGG
TTGATGTGCGCAGGCGAGTGGCGACGGGACCGACGGCTATAAAGCAGGCCAAGCACCGC
CGCCGTTCTCAATCCATCCATCCCTTAGCTGATTTGATTGACTAGCTAGTTTCAATCCCTG
CCACACTGCTAGTACTCCTCCTCGTTTCTCCTCGTGGCAATGGTACACCAGAGCAACGGCCA
CGGCGAGGCCCGCCGCCGCCGCCCAACGGCAAGAGCAACGGGCACGCCGCCGCCGCCGAA
CGGCAAGAGCAACGGGCACGCGCGCGGCCGGCGGGTGGAGTGAATTTTCGCCCGGGGCAA
GGACGGCATCCTGGCGACGACGGGGGCGAAGAACAGCATCCGGGCGATACGGTACAAGAT
CAGCGCGAGCGTGGAGGAGAGCGGGCCGCGGCCCGTGTGCTGCCGCTGGCCCCACGGTGACCC
GTCCGTGTTCCCGGCCCTTCCGCACGGCCGTCGAGGCCGAGGACGCCGTCGCCGCCGCCGCT
GCGCACCGGCCAGTTCAACTGCTACGCCGCCGGCGTCGGCCTCCCCGCCGCACGAAGGTA
ACATTTACAGCTTCACCGTAATGTATGCGTGAGCATGCATGCGCCGGTTTACTTACGTGC
CCGCCGCTGTTCTTCCCGGTGCGTTCAAAATTTTAACCTTCTATAAGTACCTTATAAAA
ACAAACAGCGCCGTAGCAGAGCACTTGTACAGGGCGTGCCCTACAAGCTATCGGCCGAC
GACGCTTTCCTCACCGCCGGCGGAACTCAGGCGATCGAAGTCATAATCCCGGTGCTGGCC
CAGACTGCCGGCGCCAACATACTGCTTCCCGGCCAGGCTATCCAAATTACGAGGCGCGA
GCGGCATTCAACAAGCTGGAGGTCCGGCACTTCGACCTCATCCCCGACAAGGGGTGGGAG
ATCGACATCGACTCGCTGGAATCCATCGCCGACAAGAACCACCGCGATGGTCATCATA
AACCCAAACAATCCGTGCGGCAGCGTTTACTCCTACGACCATCTGGCCAAAGGTTTTGCAT
CCATGCATCCTCTGCCTCGTTGATCGACCGGTCTGTTTGAACATAGTATATGGATTGCGT
TTGCTAATCGTGTGCTGATGATGCTGTTTGGTTATCAGGTCGCGGAGGTGGCAAGGAAGC
TCGGAATATTGGTGATCGCTGACGAGGTTTACGGCAAACCTGGTTCTGGGCAGCGCCCCGT
TTATCCCGATGGGCGTCTTTGGGCACATTGCCCCGGTCTTGTCCATTGGATCTCTGTCCA
AGTCGTGGATAGTGCTTGGATGGCGACTTGGATGGGTGGCGGTGTACGACCCACAAAGA
TTTTAGAGAAAACCTAAGGTAGCTTTAGCTCCCTATCATTCTTCTCATATGCTACTGTGGG
GATTAGTATTTTTGCTAAATTTGTACTGCCTTTGTTTATTTCAGATCTCTACGTCTATTAC
GAATTACCTTAATGTCTCAACGGACCCAGCAACCTTCGTTTCAGGTTAGTCTTTGGTTCTT
GCCCTATTTTGCTCATGTCCCTGTGTTGCATGTCAAATGACCGGCTTCAAGTTAGTATAT
AGAGTTTTTGTAAAGTGTGAATGTGAAGTCCAACATGATGGAAGAAAGATACATCTATT
TTTAGTCATTCCCCTTTGTGTTGTTGATTCCATAAAATAAATAAACACAAAGCCAGAACC
AACTATTGAATAGAATATTTTTCTTAGAAAATATACATTGTATTTTGAGCATGCCATAT
TCTTTTCGATCAAGTATGCAATATATTAACCTTGCATTGTACTACGAGTATACCATGTT
GTTAAGAATTTCTTTACCTACAACACCTTGTCTCGCATCTTCATATTTTGATATCCTTGA
CATTATTGTTCTCTTATGATTACACAACCTTAATTTATGGATTTTTGTGCTATCAAATGTT
TTAGGAAGCTCTTCCTAAATTTCTTGAGAACACAAAAGCAGATTTCTTTAAGAGGATTAT
TGGTCTACTAAAGGAATCATCAGAGATATGTTATAGGGAAATAAAGGAAAACAAATATAT
TACGTGTCCTCACAAGCCAGAAGGATCGATGTTTGTAAATGGTAAGCTAAGCATAGACTTA
CTTTTTAAGGTTAATCTGGGATCTCAGTGCATCCAACAACAATCAAATCAAATATAAT
TATGTTTTTGCTATGGATCTTTTTGAAGATGCATGCATTTGAAGAATAATGAAGAGAGTTG
AAATTATTTTAGGACTAATCTTCTGATATCATTTGTCCATTTTTTTGTTATTACTGTAA
ATTGGTAACACTCAAATCATATTACAAAAGTTTCTCCCATTTTTTAGTAAGATTGACTT
CCTTCTATAACCATGTATTAACCTCCATGTAAACAGGTCAAACCTAACTTACATCTTTT
GGAGGAGATCCATGACGACATAAATTTTTGCTGCAAGCTCGCAAAGGAAGAATCTGTAAT
TTTATGTCCAGGTAGGAATGTATATGGCCATTTTAAAGGAAAACCTATATGGAATAATAAT
ATCTTCTTGTATATACTAAACAATACTTCTCCATCCTAAAATAAATGTCTTACACTTAGC
ACAATTTTATACTAGATCTAGTACAAAGTTGAAACAGTTATTTTGGGACAGAGGGAGTAG
TATATATTGTGTGAGAACATAAGGTTATGTTTGAAGTATATATGCTTCTTAAATGTGAAA
CATGTTCTCTTATGTTTTTTGATTGTATACGAAGTTCTTATCAGTTTCCGAGATGACTAC
ACATAAATGATTACCATATCATTTGTGAGAAAATGTATTACCACATTAGAATATTCTTTCT
TTTTATGCAAAGACTAGCATGGCATGTACTTTTCTTGTACCTATGTGTCTTTTTTTTTT

TCGTTACATGTTTGTGCTTCTCACAAAAATAATAATACCAAGCACATGTTCCAAATGATT
ATTAATAATTTTGAGGTGTTTTTCAACCAACTTATATACTTTCATAGTTCTAAAAAACC
GTATATATGGTTAACTCTAACAAAACTTATATATGTTTTCTCTCTAATACAGGGAGTGT
TCTTGGAATGGAAAATTGGGTCCGTATTACTTTTGCCTGCGTTCCATCTTCTCTTCAAGA
TGGACTCGAAAGGGTCAAATCATTCTGTCAAAGGAACAAGAAGAAGAATTCTATAAATGG
TTGTTAGTTGTACACACCCCTAGTTGTACATCTGACTGAAGCTGTAAATCATTCTAGTT
ATCCCCATTTATATATTTCAATAAAACATATTGTAATGGTTCTGTTGTAGCTGTCCAAGT
CATGTACTCTACTTTTTGATGTATTTGGCCTCATTCGCTTGCATCAGTTTCAATAAAAAAT
GGTTGTGTACACAATGATGATGTAGAGGCGAGGTGTTTTGACCACCTTTTCAACAAAAAT
CTATATCTTTCAACAAATGAAACCTTGAGTTCCCTTTGAGTAGAAGTCAACATACTCCTT
GAATATGCTATGGTTTCCATGGTCTGGATGAAACATGATGAATAGAAGTGAAGTTATATC
CATGTCAAAGTTTTTTAATGTTTAAATTCATTATGAGAACTTTGATATTACTTCTAGCAC
ACATTCTCTGAAGTAATTGTCAGTTTGGTACTTGAAGGGACCTATATTTTTCTATTGGG
GGGGGGGGGTGAATAGGCGGTTTATAACCAATTGTATATTTGAGAATATCTTAATGTGGA
ATTAAACTAGGTGAATATTTTTTCCAATAAAGGGTGCTTTTATTGACTCACAAATGTACCA
TCAAGGGATACAATCATAATGAGTACACAATCGACATCTACATAATCAGGTTCATACGG
CCAACACACACACACGCACACACACATTCACACACACAAATCATGCTGACGAAGAGCGAA
GTCATACAAGATCAAAACTATGCCTAGGCGGAGGAAGAATAGAAAAACATGAAGAAATGA
AAAACCGTGACTGACAACATACTGACCATCGACGACAAACATCTGTAGACAACACAAAAA
CTGCGAGAAAAGTTCTATAAAACTGGCGCCTTCGAGAAGGAAACGACGTGCAAGAGTTGC
CATCATCGGATCCAACCACTAAGGTCATATCCTGGGTTTTTCATCCTGAAGATCAAATCCG
AGCAAACCTCCGAGTAATGTCTTTATTAGGGTAACGATTCAAAAAATGCCACAATCATGAG
TTATGACCAATTAGACCAGACCTAGGATTTTTTATCCAAAGCTCGAGACGGGTACTCTAGA
AGTACCATCCAATTGAAGTCATCCCACTTGCCCTCAATACAAATAGTTGCATAGATGCACG
GTCCATATGGCGAGTAATGGACATGAGCGCGCATGTGTAGGTTAACGTGACGTGACAAGA
GCCTGTGCGCCACCACTCGACGAAGTGTTTGTATGGGGAGGAAGAAGTATGGCTCCACCAAC
ATCCCAAGTTTGAAACATTCTAGAGCCCCCTTACCATACTCACAAAGCGACAATTGATGAC
TATCTGTATCAGACGACAAATCCATGTCCGTCACCTCGCTCTATCTTGGTCAATTGACATAC
TACCTGGCAAAGGCGGATTCAAGCCCCAGACAGCCTGGGCGGCCGC

第 10 図

ctcgatcccattgcaatggtatgattagctatcaaacgaaagaaagagatggcatgtgco
 ctgtgtgtcatccctcactggcttggcgaatggcgataccgagttaggtagagtgtttt
 ttagcatgatgtctgcggcactgccaagaaaactgcgtgcagcggactgcaggagagtt
 gagcgatgcatgctttgtgatgagcggagctgagtgggtgtcactaactgaacccaatca
 gcattgggtgagtcgagtcgagaagcatcatgcttctcgtgcgtcccgatccgcttatcttt
 ttctcccaaattattaaagagggatagatgatgggtgtgctgggttgggttagagtacgtgc
 atagaaccaaagcgaggcgccgaaaatatgccggggataatgggtggcaggccgcaacggc
 cagccccgtcagctggcagcggcgtgccagagcgtgccagagcgtgcgcgcgtgcgtgct
 tcttgcgtgccggccccgggttcgtgtgcggtcagagcaacggctatataggaccgtcaatc
 accgctactcaatccgtccccaactcgtttcctattacCGCTACTAGTAGTATTCCTGTT 600

GTAGTCTAGTAGTACTCCTCCTCCTCCTTCTCCTCCTACCCGTTTCCTCATGGCCACCGT
 M A T V NAAT-B

ACGCCAGAGCGACGGAGTCGCCGCGAACGGCCTTGCCGTGGCCGCAGCCGCGAACGGCAA
 R Q S D G V A A N G L A V A A A A N G K

GAGCAACGGCCATGGCGTGGCTGCCGCCGTGAACGGCAAGAGCAACGGCCATGGCGTGA
 S N G H G V A A A V N G K S N G H G V D

TGCCGACGCGAACGGCAAGAGCAACGGCCATGGCGTGGCTGCCGACGCGAACGGCAAGAG
 A D A N G K S N G H G V A A D A N G K S

CAACGGCCATGCCGAGGCCACTGCGAACGGCCACGGCGAGGCCACTGCGAACGGCAAGAC
 N G H A E A T A N G H G E A T A N G K T

CAACGGCCACCGCGAGAGCAACGGCCATGCTGAGGCCGCCGACGCGAACGGCGAGAGCAA
 N G H R E S N G H A E A A D A N G E S N

CGAGCATGCCGAGGACTCCGCGGCGAACGGCGAGAGCAACGGGCATGCGGCGGCGGCGGC
 E H A E D S A A N G E S N G H A A A A A

AGAGGAGGAGGAGGCGGTGGAGTGGAATTTGCGGGTGCCAAGGACGGCGTGCTGGCGGC
 E E E E A V E W N F A G A K D G V L A A

GACGGGGGCGAACATGAGCATCCGGGCGATACGGTACAAGATCAGCGCGAGCGTGCAGGA
 T G A N M S I R A I R Y K I S A S V Q E

GAAGGGGCGCGGCCCGTGCTGCCGCTGGCCACGGGGACCCGTCCGTGTTCCCGGCCTT 1200
 K G P R P V L P L A H G D P S V F P A F

CCGCACGGCCGTCGAGGCCGAGGACGCCGTCGCCGCCGCGCTGCGCACCGGCCAGTTCAA
 R T A V E A E D A V A A A L R T G Q F N

CTGCTACCCCGCCGGCGTCGGCCTCCCCGCCGCACGAAGgtaacaacaacaacaacaaa
 C Y P A G V G L P A A R S

gaacaattttccttttgcgtgtcgtgtcgcgcggcaatccatgcatgcgcgtgtgcgcgt
 ttcacgtgtccgtccgtccgtccaccgttccttccctccctacgcccatgagaaatct

gaccttctccaccttataccaaacaaaaacaaaaaacacagCGCCGTGGCAGAGCACCT
A V A E H L
GTCGCAGGGCGTGCCGTACATGCTATCGGCCGACGACGTCTTCCTCACCGCCGGCGGGAC
S Q G V P Y M L S A D D V F L T A G G T
CCAGGCGATCGAGGTCATAATCCCGGTGCTGGCCCAGACCGCCGGCGCCAACATTCTGCT
Q A I E V I I P V L A Q T A G A N I L L
CCCCAGGCCAGGCTACCCAACTACGAGGCGCGCGCCGCGTTCAACAGGCTGGAGGTCCG
P R P G Y P N Y E A R A A F N R L E V R
GCATTTTCGACCTCATCCCCGACAAGGGGTGGGAGATCGACATCGACTCGCTGGAATCCAT
H F D L I P D K G W E I D I D S L E S I
CGCCGACAAGAACACCACCGCCATGGTCATCATAAACCCCAACAACCCGTGCGGCAGCGT 1800
A D K N T T A M V I I N P N N P C G S V
TTACTCCTACGACCATCTGTCCAAGgtttcacatcctttgccttgctgaatatggattca
Y S Y D H L S K
gttcagtgcacctgctgaattctttttgccaatcgcatactgactgatgttgctcaatta
gGTCGCGGAGGTGGCGAAAAGGCTCGGAATATTGGTGATTGCTGACGAGGTATACGGCAA
V A E V A K R L G I L V I A D E V Y G K
GCTGGTTCTGGGCAGCGCCCCGTTTCATCCCAATGGGAGTGTTTGGGCACATCACCCCTGT
L V L G S A P F I P M G V F G H I T P V
GCTGTCCATAGGGTCTCTGTCCAAGTCATGGATAGTGCCTGGATGGCGGCTTGGATGGGT
L S I G S L S K S W I V P G W R L G W V
AGCGGTGTACGACCCAGAAAGATCTTACAGGAACTAAGgtacttaaattctctatatca
A V Y D P R K I L Q E T K
ttcttttcaaattgctactaagggtgattaatttagtactactgtacaatatatttgctaaat
ttgtactgacattttttgtggttagATCTCTACATCAATTACGAATTACCTCAATGTCTCGA
I S T S I T N Y L N V S
CAGACCCAGCAACCTTCATTCAGgtcagtccttttggtattttacctcgtttcaagaaataaa
T D P A T F I Q
gtcttttggtattttactcctccttgctcctattttgctccggtccctatggttgtaggcagcc 2400
cacgtgcatgtcaagtgaacgtttttttcacattaagtttgaaagtcaaagtcagacacat
acacttgtagttattttacctttgtttgctttgatccgataaaaataaaaaatacaaaaa
ctgaacctactgttgaatataaacactgttccttacaagatatacatgattgcactatggg
catgccatattcttttggtcaagtatgcagtatgttggaacctcttttagaaaaatagat
acattgtactatgagtataccattttattaagaatttcataattttgatatccttgatggt
attgttctcttggtgattcacacgatttacttgtggtttttttgtactatcaaattgttcag
GCAGCTCTTCCTCAGATTCTTGAGAACACAAAGGAAGATTCTTTAAGGCGATTATTGGT
A A L P Q I L E N T K E D F F K A I I G

aaagaaatccgagaaaaagccaactgggaatagcacatggaaaaacccagccgtccgcgc
 actgtgtaaagctataagtgagccggcccaagcctcgtcgtctcatcataccctgtgcca
 aaccccgacaattcgttgcaactatgcggcgaataggcttttccaggagctcctgtcttcc
 ggttatgggtcatttgcacacccctcctccacttggggccaggctattatacttttttcc
 ttctttcgacctcacgttactacgccagtttagtttttggaagcgaccaaccggttttgt
 gaaggttctagaaactcaaccatttttgggaagcttctagaagcctatgaatgtttcttt
 tggacatgtattatttgtgttttttctttttcaaattgcacaatcctttttcaaattcat 5400
 gatttttgtgaaacttgtgattttttgaatccgtgatttttttctaaatccgtgtttt
 gaaaaaaactgtggacttttccgaaattaatgaacatttgtttgcaagatcgatgatcct
 tttcaaatgagcgatttttttctaaaataatccacataatttttcataattcataagctttcc
 ttttaatcgtgaactatcttagcatttgggtgaacttttattaattttctttataaaatga
 ttttttttcaaaagccaacgggttaacgggttgaccgctgaaccacaaccacaaccgggga
 aaccattgactcgtcgaacagggcagggtttcatatgattgggtggtctaataaccagcg
 cccctgactactaaacgaaggaattgcaaattttaccaaccactactatggtaaaaaatg
 aatatcacgataaaaaaggggaaaaaaaactataccctgaaaaatccctctgtttctaat
 atttgttgttggggagaactaatctgaaagaactaatctagtctcgcgaataacaaata
 ttatgattcgggggggagtataactattacacgatcaaccaaagaatgtcctccaagaaaa 6000
 acccaaagaaagtgcctagagttttgttttcaaggaccgaaagatagagatagcattctga
 attaggtccatcttttttccaaggattgaaagaaagagatagaattctgaattaggtgcg
 gagatatcatttctggattaggtacaattgttttgcgggcacagccaaaccccgagtg
 agccggaattggaattgagtggttgagtcgagaagcatggttcatgcgttctcaaagag
 tgtagccagtagtggtgtgctccttgggtgctggagctgcataatacaagtacataaaacaaa
 gacgatcagctggcagcgtgcctgcagtcgtgcttcttgcgtgcgcgccccggaagccccgg
 ttgatgtgcgcaggcgagtggcgacgggaccgacggctataaagcacggccaagcacccgc
 cgccgttctcaatccatccatcccttagctgatttgATTGACTAGCTAGTTTCATTCCTG

CCACACTGCTAGTACTCCTCCTCGTTTCCTCGTGGCAATGGTACACCAGAGCAACGGCCA

M V H Q S N G H NAAT-A

CGGCGAGGCCCGCCGCGCCGCGCCGCAACGGCAAGAGCAACGGGCACGCCGCGCCGCGAA 6600

G E A A A A A A N G K S N G H A A A A N

CGGCAAGAGCAACGGGCACGCGGCGGCGGCGGCGGTGGAGTGGAATTTGCCCCGGGGCAA

G K S N G H A A A A A V E W N F A R G K

GGACGGCATCCTGGCGACGACGGGGGCGAAGAACAGCATCCGGGCGATACGGTACAAGAT

D G I L A T T G A K N S I R A I R Y K I

CAGCGCGAGCGTGGAGGAGAGCGGGCCGCGGCCCGTGCTGCCGCTGGCCACGGTGACCC

S A S V E E S G P R P V L P L A H G D P

GTCCGTGTTCCCGGCCTTCGCGACGGCCGTCGAGGCCGAGGACGCCGTCGCCGCGCGCT

S V F P A F R T A V E A E D A V A A A L

GCGCACCGGCCAGTTCAACTGCTACGCCCGCGNNTCGGCCTCCCCGCCGCACGAAGgta

R T G Q F N C Y A A G V G L P A A R S

acatttacagcttcaccgtaatgtatgcgtgagcatgcatgcgcgggtttacttacgtgc
 ccgcccgtgttcttccccgggtgcgttcaaaattttaaccttctataagttacattataaaa
 acaaacagCGCCGTAGCAGAGCACTTGTACAGGGCGTGCCCTACAAGCTATCGGCCGAC

A V A E H L S Q G V P Y K L S A D

GACGTCTTCCTCACCGCCGGCGGAACCTCAGGCGATCGAAGTCATAATCCCGGTGCTGGCC
D V F L T A G G T Q A I E V I I P V L A

CAGACTGCCGGCGCCAACATACTGCTTCCCCGGCCAGGCTATCCAAATTACGAGGCGCGA 7200
Q T A G A N I L L P R P G Y P N Y E A R

GCGGCATTCAACAAGCTGGAGGTCCGGCACTTCGACCTCATCCCCGACAAGGGGTGGGAG
A A F N K L E V R H F D L I P D K G W E

ATCGACATCGACTCGCTGGAATCCATCGCCGACAAGAACCACCGCGATGGTCATCATA
I D I D S L E S I A D K N T T A M V I I

AACCCAAACAATCCGTGCGGCAGCGTTTACTCCTACGACCATCTGGCCAAGgttttgcac
N P N N P C G S V Y S Y D H L A K

ccatgcatccctctgcctcggttgatcgaccggtctgtttgaacatagtatatggattgcgt
ttgctaatcggtgtgctgatgatgctgtttggttatcagGTCGCGGAGGTGGCAAGGAAGC
V A E V A R K

TCGGAATATTGGTGATCGCTGACGAGGTTTACGGCAAACCTGGTTCTGGGCAGCGCCCCGT
L G I L V I A D E V Y G K L V L G S A P

TTATCCCGATGGGCGTCTTTGGGCACATTGCCCGGTCTTGTCCATTGGATCTCTGTCCA
F I P M G V F G H I A P V L S I G S L S

AGTCGTGGATAGTGCCTGGATGGCGACTTGGATGGGTGGCGGTGTACGACCCACAAAGA
K S W I V P G W R L G W V A V Y D P T K

TTTAGAGAAAACCTAAGgtagcttttagctccctatcattcttctcatatgctactgtggg
I L E K T K

gattagtatTTTTgctaaatttgtactgcctttgtttattcagATCTCTACGTCTATTAC 7800
I S T S I T

GAATTACCTTAATGTCTCAACGGACCCAGCAACCTTCGTTTCAGgttagtcttttggttctt
N Y L N V S T D P A T F V Q
gccctatTTTTgctcatgtccctgtgttgcatgtcaaagaccggttcaagttagtatat
agagtTTTTgttaagtgtgaatgtcgaagtccaacatgatggaagaaagatacatctatt
tttagtcatcctcctttgtttgtttgattccataaaaataaaacacaaagccagaacc
aactattgaatagaactatTTTTcttagaaaatatacattgtatTTTgagcatgccatat
tcttttcgatcaagtatgcaatatattaaaacttgcattgtactacgagtataccatgtt
gttaagaatttctttacctacaacaccttgtctcgcatcttcataTTTTgatatccttga
cattattgttctcttattgattcacacaacttaattatggattTTTTgtgctatcaaattgt
ttagGAAGCTCTTCCTAAATTCCTTGAGAACACAAAAGCAGATTCTTTAAGAGGATTAT
E A L P K I L E N T K A D F F K R I I

TGGTCTACTAAAGGAATCATCAGAGATATGTTATAGGGAAATAAAGGAAACAAATATAT 8400
G L L K E S S E I C Y R E I K E N K Y I

TACGTGTCCTCACAAGCCAGAAGGATCGATGTTTGTAAATGgtaagctaagcatagactta
T C P H K P E G S M F V M

ctttttaagggttaatctgggatctcagtgcatccaacaaacaatcaaatacaaaatataat
tatgttttgctatggatctttttgaagatgcatgcatttgaagaataatgaagagagttg
aaattattttaggactaatcttcctgatatcatttgtccatttttttgttattactgtaa
attggtaacactcaaatacattacaaaaagtttctctccatttttagtaagattgactt
cctttctataaccatgtattaacttccatgtaaacagGTCAAATAAATTACATCTTTT
V K L N L H L L

GGAGGAGATCCATGACGACATAAATTTTTGCTGCAAGCTCGCAAAGGAAGAATCTGTAAT
E E I H D D I N F C C K L A K E E S V I

TTTATGTCCAGgtaggaatgtatatggccatttttaaaggaaaactatatggaataataat
L C P

atcttcttgttataactaaacaataacttctccatcctaaaaataaatgtcttacacttagc
acaattttatactagatctagtacaaagttgaaacagttattttgggacagagggagtag 9000
tatatatgtgtgagaacataagggttatgtttgactgatatatgcttcttaaatgtgaaa
catgttctcttatgttttttgattgtatacgaagttcttatcagtttccgagatgactac
acataaatgattaccatatcattgtcagaaaatgtattaccacattagaatattctttct
ttttatgcaaagactagcatggcatgtacttttctgtacctatgtgtcttttttttttc
tcgttacatgtttgtgcttctcacaaaaataataaccaagcacatgttccaaatgatt
attaataattttgaggtgtttttcaaccaacttatatactttcatagttctaaaaaaacc
gtatatatgggttaactctaacaaaaacttatatatgttttctctctaatacagGGAGTGT
G S V

TCTTGGAATGGAAAATTGGGTCCGTATTACTTTTGCCTGCGTTCCATCTTCTCTTCAAGA
L G M E N W V R I T F A C V P S S L Q D

TGGACTCGAAAGGGTCAAATCATTCTGTCAAAGGAACAAGAAGAAGAAATTCTATAAATGG
G L E R V K S F C Q R N K K K N S I N G

TTGTTAGTTGTACACACCCTAGTTGTACATCTGACTGAAGCTGTAAATCATTTCTAGTT 9600
C *

ATCCCCATTTATATATTTCAATAAAACATATTGTAATGGTTCTGTTGTAGCTGTCCAAGT

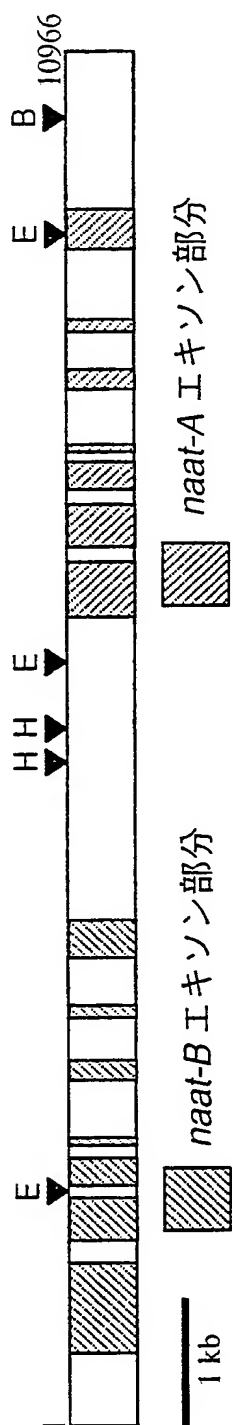
CATGTACTCTACTTTTTGATGTATTTGGCCTCATTGCCTTGCATCAGTTTCAATAAAAAT

GGTTGTGTACACaatgatgatgtagagggcgaggtgttttgaccaccttttcaacaaaaat

ctatatctttcaacaaatgaaacottgagttccctttgagtagaagtcaacatactcctt
gaatatgctatggtttccatgggtctggatgaaacatgatgaatagaagtgaagttatatc
catgtcaaagtttttttaattgtttaatttcattatgagaactttgatattacttctagcac
acattctctgaagtaattgtcagtttggtaacttgaagggacctatatttttcctattggg
gggggggggtgaataggcggtttataaccaattgtatatgttgaataatcttaattgtgga
attaaactaggtgaatatttttccaataaaggggtgcttttattgactcacaatgtacca
tcaagggatacaatcataatgagtacacaatcgacatctacataatcaggttgcatacgg 10200
ccaacacacacacacgcacacacacattcacacacacaaatcatgctgacgaagagcgaa
gtcatacaagatcaaaactatgcctaggcgagggaagaatagaaaaacatgaagaaatga
aaaaccgtgactgacaacatactgaccatcgacgacaaacatctgtagacaacacaaaaa
ctgcgagaaaagttctataaaactggcgcccttcgagaaggaaacgacgtgcaagagttgc
catcatcgatccaaccactaaggtcatatcctgggttttcatcctgaagatcaaatccg
agcaaaactccgagtaatgtctttattagggtaacgattcaaaaaatgccacaatcatgag

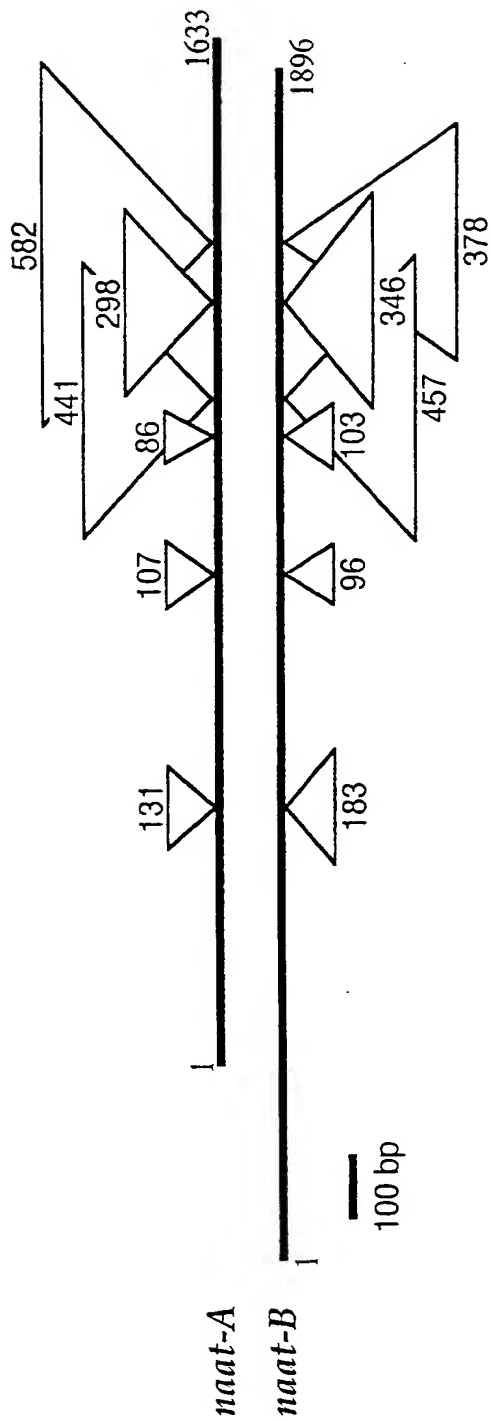
ttatgaccaattagaccagacctaggatTTTTATCCAAAGCTCGAGACGGGTACTCTAGA
agtaccatccaattgaagtcATCCCACTTGCTCAATACAAATAGTTGCATAGATGCACG
gtccatatggcgagtaatggacatgagcgcgcATGTGTAGGTTAACGTGACGTGACAAGA
gcctgtcgccaccactcgacgaagtgtttgatggggaggaagaagtatggctccaccaac 10800
atcccaagtttgaaacattctagagccccttaccatactcacaagcgacaattgatgac
tatctgtatcagacgacaaatccatgtccgtcactcgtctatcttggtcattgacatac
tacctggcaaaggcggattcaagccccagacagcctgggcggccgc

第 1 1 図



ゲノム断片の模式図。E: *EcoRI*, H: *HindIII*, B: *BamHI*。

第 1 2 図



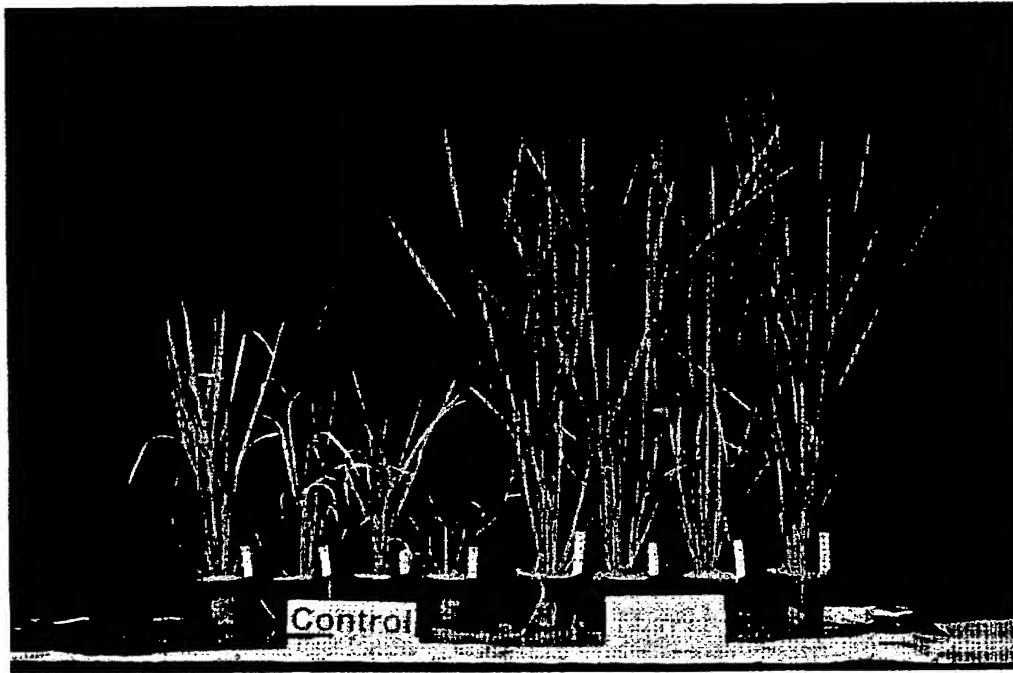
第 13 図

MVHQSNHGGEAAAAANGKSNHGHAANGKSNHGHAANAWEWNFARGKDGILATTGAKNS
IRAIRYKISASVEESGPRPVLPLAHGDPVSFPARTAVEAEDAVAAALRTGQFNCYAAGV
GLPAARSASAEHLSQGVVPYKLSADDVFLTAGGTQAIEVIIIPVLAQTAGANILLPRPGYPN
YEAAAFNKLEVRHFDLIPDKGWEIDIDSLESIADKNTTAMVIINPNNPCGSVYSYDHLA
KVAEVARKLGILVIADEVYGKLVLSAPFIPMGVFGHIAPVLSIGSLSKSWIVPGWRLGW
VAVYDPTKILEKTKISTITNYLNVSTDPATFVQEALPKILENTKADFFKRIIGLLKES
EICYREIKENKYITCPHKPEGSMFVMVKLNLHLLLEIHHDDINFCKLAKEESVILCPGSV
LGMENWVRITFACVPSSLQDGLERVKSFCQRNKKKNSINGC*

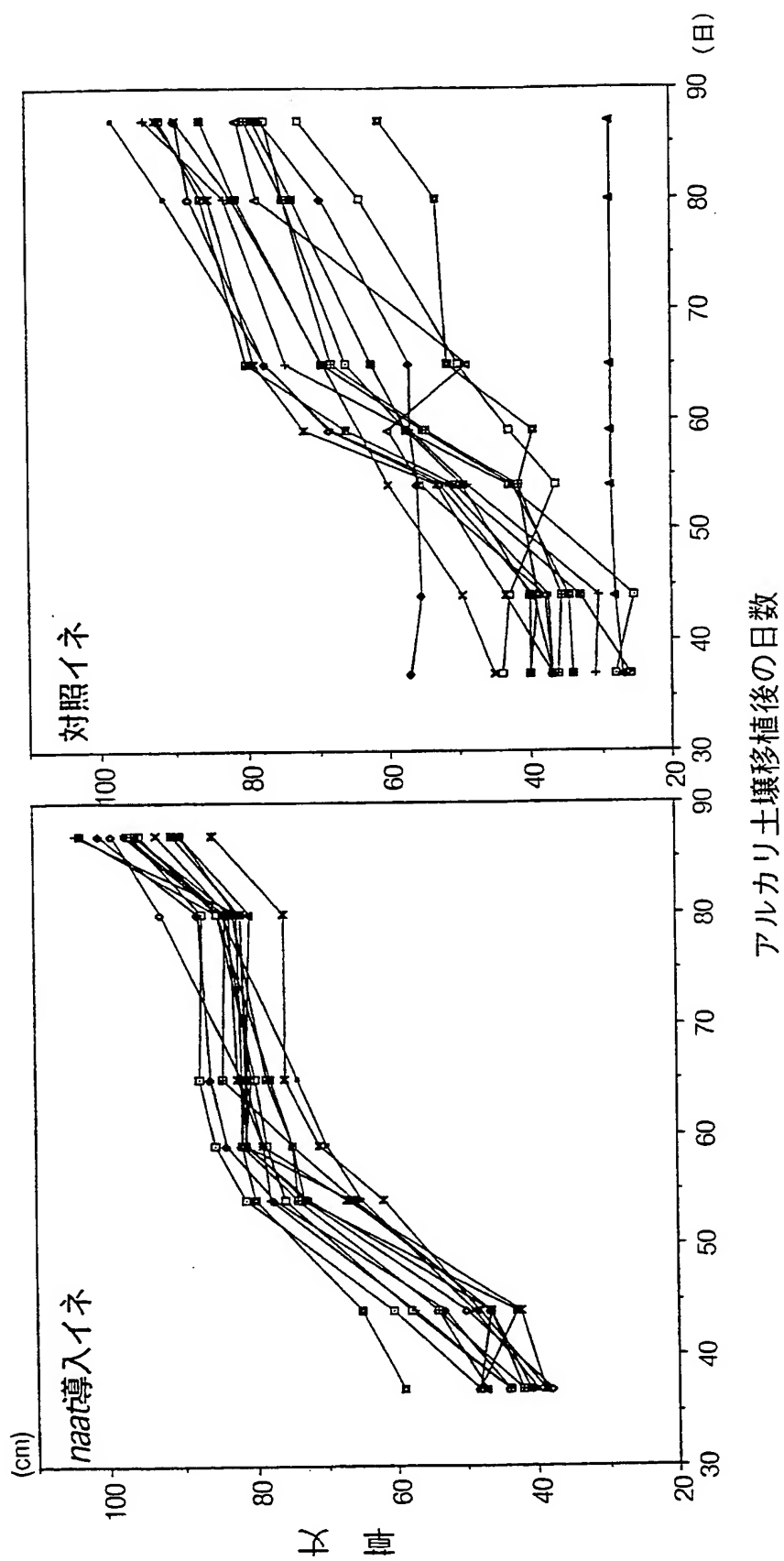
第 14 図

ATVRQSDGVAANGLAVAAAANGKSNHGVAAVNGKSNHGVDDADANGKSNHGVAAADAN
GKSNHGAETANGHGEATANGKTNGHRESNGHAEADANGESNEHAEDSAANGESNGHAA
AAAAEEEEAVEWNFAGAKDGVLAATGANMSIRAIRYKISASVQEKGPRPVLPLAHGDPVSF
PARTAVEAEDAVAAALRTGQFNCYPAGVGLPAARSASAEHLSQGVPMYLSADDVFLTAG
GTQAIEVIIIPVLAQTAGANILLPRPGYPNYEAAAFNRLEVRHFDLIPDKGWEIDIDSLE
SIADKNTTAMVIINPNNPCGSVYSYDHLKVAEVAKRLGILVIADEVYGKLVLSAPFIP
MGVFGHITPVLSIGSLSKSWIVPGWRLGWVAVYDPRKILQETKISTITNYLNVSTDPAT
FIQAALPQILENTKEDFFKAIIGLLKESSEICYKQIKENKYITCPHKPEGSMFVMVKLNL
HLLLEIDDDIDFCKLAKEESVILCPGSVLGMANWVRITFACVPSSLQDGLGRISFCQR
NKKRNSSDDC*

第 1 5 図



第 16 図



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<110> Mori, Satoshi

<120> Creation of the transgenic graminaceous plants tolerant to
Fe-deficiency in calcareous soils

<130> JA903969

<150> JP 11-190318

<151> 1999-07-05

<160> 1

<210> 1

<211> 10966

<212> DNA

<213> *Hordeum vulgare* L. var. Igri

<400> 1

ctcgatccca ttgcaatggt atgattagct atcaaacgaa agaaagagat ggcatgtgcc	60
cigtgtgtca tccctcacig gcttggcgaa tggcgatacc gagttaggta gagtgttttt	120
ttagcatgat gtctgccggc actgccaaaga aaactgcgtg cagcggactg caggagagtt	180
gagcgatgca tgctttgtga tgagcggagc tgagtgggtg tcactaactg aacccaatca	240
gcatlgggtg agtcgagtcg agaagcatca tgcttccctg gtcccgaicc gcttatcttt	300
ttctcccaaa ttattaaaga gggatagaig atgggtgtgt gggtlgggta gagtacgtgc	360

atagaaccaaa agcagaggcgc cgaaaataatg ccggggataa tggtaggcagg ccgcaacggc 420
 cacgcccgtc agctggcagc ggcgtgccag agcgtgccag agcgtgcgcg cgtgcgtgct 480
 tcttgctgcc ggccccgggt cgtgtgcggt cagagcaacg gctatatagg accgtcaatc 540
 accgttactc aatccgtccc caactcggtt cctattaccg ctactagtag tatccctggc 600
 gtagtctagt agtactccic ctcctccttc tccicctacc cgttccctca tggccaccgt 660
 acgccagagc gacggagtcg ccgcgaacgg ccttgccgtg gccgcagccg cgaacggcaa 720
 gagcaacggc catggcgtgg ctgccgccgt gaacggcaag agcaacggcc atggcgtgga 780
 tggcgacgcg aacggcaaga gcaacggcca tggcgtggct gccgacgcga acggcaagag 840
 caacggccat gccgaggcca ctgcgaacgg ccacggcgag gccactgcga acggcaagac 900
 caacggccac cgcgagagca acggccatgc tgaggccgcc gacgcgaacg gcgagagcaa 960
 cgagcatgcc gaggactccg cggcgaacgg cgagagcaac gggcatgcgg cggcggcggc 1020
 agaggaggag gaggcggtag agtggaaatt cgcgggtgcc aaggacggcg tgcgtggcggc 1080
 gacggggggc aacatgagca tccgggcgat acggtacaag atcagcgcgga gcgtgcagga 1140
 gaagggggcc cggcccgtgc tggcgtggc ccacggggac ccgtccgtgt tcccggcctt 1200
 ccgcacggcc gtgcaggccg aggacgccgt cgcgcgccgc ctgcgcaccg gccagticaa 1260
 ctgctacccc gccggcgicg gcctccccgc cgcacgaagg taacaacaac aacaacaaa 1320
 gaacaatttc ctcttcgctg gtctgtctgc gcggcaatcc atgcatgcgc atgtgccgt 1380
 ttacagtgc cgtccgtccg tccaccgttc ctctccttc cctacgcca tgagaaatct 1440
 gacctctcc cacttatac caaacaacac aaaaaaacac agcggcgtgg cagagcacct 1500
 gtgcagggc gtgccgtaca tgcatacggc cgacgacgtc ttcctaccg ccggcggggac 1560
 ccaggcgatc gaggtcataa tcccgggtgt ggcccagacc gccggcgcca acattctgt 1620
 ccccaggcca ggctacccaa actacgaggc gcgcgccgcg tccaacaggc tggaggctccg 1680
 gcaattcgac ccatccccg acaaggggtg ggagatcgac atcgactgc tggaatccat 1740
 cgccgacaag aacaccaccg ccatggctat cataaacccc aacaaccgt gcggcagcgt 1800
 ttactcctac gaccatctgt ccaaggttc acatcccttg cctgtctgaa tatggattca 1860
 gtacagtga cctgtctgaat tcttttggc aatcgcatat tgcatagt tgcataatta 1920
 ggtcgcggag gtggcgaaaa ggtcgggaat attgggtgatt gctgacgagg tatacggcaa 1980
 gctgggtctg ggcagcggcc cgttcattcc aatgggagtg ttggggcaca tcacccctgt 2040
 gctgtccata gggctctctgt ccaagtcatt gatagtgctt ggatggcggc ttggatgggt 2100

agcgggtgtac gaccccagaa agatctttaca ggaaactaag gtactttaaai ctctataatca 2160
 ttcttttcaa atgctactaa ggigtattaat tagtactact gtacaatata ttgtctaaat 2220
 ttgtactgac atttttgtgg tagatctcta catcaattac gaattaccctc aatgtctcga 2280
 cagaccagc aaccttcatt caggtcagtc ttgtgtatit accctgttctc aagaaataaa 2340
 gtctttggta ttactctctc ctgttctat ttgtctccgg tccctatgtt gtaggcagcc 2400
 cactgtcatt tcaagtacc gttttttcac attaagtttg aaagtcaaag tcagacacat 2460
 acactgttag ttattttacc ttgtttgtct ttgatccgat aaaataaaaa aatacaaaaa 2520
 ctgaacctac tgttgaatat aaccactgtt cttaacaagt atacatgatt gcactatggg 2580
 catgccatat tcttttgggt caagtatgca gtaigtgtga accctcttta gaaaatagat 2640
 acatgttact atgagtatac cattttatta agaatttcat attttgatat ccttgaiggt 2700
 atgtttctct tgtattcac acgatttact tgtgttttt tgtactatca aatgttctag 2760
 gcagctcttc ctgagattct tgagaacaca aaggaagatt tctttaaggc gatttatgtt 2820
 ctgtctaaagg aatcatcaga gataigtac aaacaaataa aggaaaacaa atacattaca 2880
 tgtcttcaca agccagaagg atcaatgttt gtcattgtta gccatatttg tgaagtaaaa 2940
 aaatcttagg gagtgtcagt aatcataaac ttatttataat aggattaatc tgggaccgaa 3000
 atgcatccaa cataattact tcaaattcaa aticaaatta catcttccg tacataatit 3060
 tgaagatgca tgtattttta gaataatgac gagagctaaa gtaatgtac gactaatcat 3120
 ctggatatcc ttgttccatc tttttgttat actgttggaat gttaatggctc aaatcataat 3180
 acacaaatat ccatgtatgt ttctagaaag attgattatt ttctgtaac catgaactcc 3240
 gtaattaacti ccatgtaac aggtgaaact gaacttcat ctittggagg aaatagacga 3300
 tgacattgat ttgtgtgca agctcgcaa agaagaatca gtaatcttat gccaggttag 3360
 gaatccattg ttgatttttg actgtatatg aagtcttat caatttccga gatgactata 3420
 catataaaig attaccatat tatggtcaga aatgttataa cagtgttaga atattctgtg 3480
 aagacttttt taacacaata ttctgtgaag actagataat atgtacttct ccttgttttc 3540
 ttgacctgat gtcttctgc acatgtgtg ctcttcacaa aaaaatagca agcacatgtt 3600
 tcaaataaai gtaataata taatttagcc tttaatttat atggttctat ttgagatat 3660
 tttgttagtc caacttatat attgtgact attctcaaaa aaaaactta tatatgtgtg 3720
 cctctcaaat gtagggagtg ttcttggaaat ggcaaactgg gtccgcatta cttttgtgtg 3780
 tgttccatct tctcttcaag atggctcgg aaggatcaaa tcatctgtc aaaggaacaa 3840

gaagagaaaat tcgagcgaatg attgctagtt gtatatctga ctgaagcgtt aaatcattcc 3900
 cagtatcccc atctataatct ttcaataaaa tggaaacttt agttctctat gaatagaagt 3960
 caacatctcc ttgaataatgt tctgggttgt gtggccctgga cgaaacatag tgaatgttat 4020
 gttagtgaaag ttacattggc gtcgaagatc ttigaagttt tttttttttt ttggggggggg 4080
 gggggggggg tgccttgata ttactcttaa gtacacgttc tctcaagtta tgtcaaagca 4140
 ctttgtlaaac aattgttagat ttggtaatcat gataatggatt aaactagica gatacttggg 4200
 aagcacaaac cctacctaag ttaggctcac taaggctggcg ttgggttcga gagagaggaa 4260
 ggatcagttg atgataatccc caatcatcga agtaaatcat gtgttgttgc taccactttt 4320
 ctacaatcct agtagctgca tgcgttgagc tactgatcaa caccactgca caaccataat 4380
 ctctgtgcaa aatcggcacc caaagattac atctcacagc tgaagcaacc accaaatttg 4440
 aagagaggaa cctcacaaaa gacctttgag tgcctccac aatgcatggt taggccgccg 4500
 tgcgagccg gagtggtcac catgcggacc aacaccaact ccaacggggg agcacgtcac 4560
 cgattactga aatccccaa acaattctta atttgtgaac aaaattttaa aacaggaaca 4620
 attttgaat ttgtgaacaa atttttttaa cgggtattcc tgaacatttt tcaaaattgt 4680
 gatcaaaatt ttaaaacgac ttctttctca aatttgagca atattttaa ttataaaaaa 4740
 gttcaacaat ttigaacttt ttaaaaattt gcgagaacat tttgaaattc taaatatttt 4800
 cgaatttgga acattttttc tatttctgaa caaaaattga aaatacgaac glaatttgga 4860
 ataaattttg gaaaaatgca ttttttgaaa ttctgaaca tattttgaaa aacaaaaaaa 4920
 ctttaaaagg taaaataaaa ataaaataaa aatagaaaca taaaataag caaaaaaata 4980
 aaagaaatcc gagaaaagcc aactgggaat agcacatgga aaaaccagc cgiccgccgc 5040
 actgtgtaaa gctataagtg agccggccca agcctcgtcg tctcatcata cctgtgca 5100
 aaccccgaca attcgttgca ctatgcggcg aataggcttt tccaggagct cctgtcttcc 5160
 ggttatgggt catttgcaca cccctccctc acttgggcca ggctattata cttttttcc 5220
 ttctttcgac ctacagtac tacgccagtt tagtttttgg aagcgaccaa ccggttttgt 5280
 gaaggttcta gaaactcaac catttttggg aagcttctag aagcctatga atgtttcttt 5340
 tggacatgta ttatttgtgt tttttctttt tcaaatlgca caatcttttt tcaaatcat 5400
 gatttttgtg aaacttltga ttttttgaat ccgtgatatt ttttctttaa tccgtgtttt 5460
 gaaaaaaact gttgactttt ccgaaattaa tgaacatttg ttgtcaagat cgatgatcct 5520
 ttcaaatga gcgatttttt tctaaaatat ccacataatt ttcatattca taagctttcc 5580

ttttaatcgt gaactatctt agcatttggg gaactttttat taatttttctt tataaaatga	5640
tttttttttca aaagccaacg gttaacgggt gaccgctgaa ccacaaccac aaaccgggga	5700
aaccatlgac tcgcigaaca gggcagggc ttcataatgat tgggtgggtc aataccagcg	5760
ccccigacta ctaaacgaag gaattgcaaa ttttaccaac cactactatg gtiaaaaaatg	5820
aatatcacga taaaaaagg gaaaaaaaac tataccctga aaatccctct gtttctaaat	5880
atttgttgtt ggggagaact aatctgaaag aactaatctt gtctctccgca ataacaaata	5940
ttaatgattcg gggggagiat aactattaca cgatcaacca aagaatgtcc tccaagaaaa	6000
acccaaagaa agtgctagag ttttgttttc aaggaccgaa agatagagat agcatcttga	6060
attagggtcca tctttttccc aaggattgaa agaaagagat agaattctga attagggtcg	6120
gagataatcal ttctggattt ggtacaattg ttttgccggc acagccaaac cccgcagtgg	6180
agccggaatt ggaattgagt ggggtggagt gagaagcatg gtctcatgct tctcaaagag	6240
tgtagccagt agtgtgtgt ccttgggtgt ggagctgcat atacaagtac ataaaaacaa	6300
gacgatcagc tggcagcgt cctgcatgct tgcctcttgc tgcgcggccg gaagccccgg	6360
tigtatgtgc caggcgagtg gcgacgggac cgacggctat aaagcacggc caagcaccgc	6420
cgccgttctc aatccatcca tcccctagct gatttgattg actagctagt tcatctccctg	6480
ccacactgct agtacctctc ctctgttctt cgtggcaatg gtacaccaga gcaacggcca	6540
cggcgaggcc gccgccggc cgcacaacgg caagagcaac gggcacgccc ccgccgcgaa	6600
cggcaagagc aacgggcacg cggcggcggc ggcggtggag tggaaatttc cccggggcaa	6660
ggacggcatc ctggcgacga cgggggcgaa gaacagcatc cgggcgatac ggtacaagat	6720
cagcgcgagc gtggaggaga gcgggcccgc gcccgigtg ccgctggccc acggtagacc	6780
gtccgtgttc ccggcccttc gcacggccgt cgaggccgag gacgccgtc ccgccgcgt	6840
gcgcaccggc cagttcaact gctacgccgc cggcgtcggc ctccccgccc cacgaaggta	6900
acatttacag ctacaccgt atgtatgct gagcatgcat gcgccgggtt acttacgtgc	6960
ccgccgtgt tcttccccgg tgcgttcaaa attttaacct tctataagta ctttataaaa	7020
acaaacagcg ccgtagcaga gcacttgtca cagggcgtgc cctacaagct atcggccgac	7080
gacgtcttcc tcaccgccgg cggaactcag gcgatcgaag tcaataatccc ggtgtctggc	7140
cagactgccg gcgccaacat actgtctccc cggccaggct atccaaatta cgaggcgca	7200
gcggcatcca acaagctgga ggtccggcac ttcgacctca tccccgacaa ggggtgggag	7260
atcgacatcg actcgctgga atccatcgcc gacaagaaca ccaccgcgt ggtcatcata	7320



aacccaaaca aiccgigcgg cagcgittac icciacgacc aictggccaa ggittitgcal 7380
ccatgcatcc icigccicgt igatcgaccg gicigittga acatagtata iggattgcgt 7440
itgctaaticg igigcigaig aigctgittg gttatcaggt cgcggaggig gcaaggaagc 7500
icggaatatt ggtgalcgt gacgaggitt acggcaaact ggittcigggc agcgccccgt 7560
ttaicccgat gggcgicitt gggcacattg ccccggtcct giccatigga tctcigicca 7620
agtcgtggat agtgccigga iggcgactig gatgggtggc ggtgtacgac cccacaaaga 7680
ttttagagaa aactaaggta gctttagctc cctatcattc ttctcataig ctactigggg 7740
gattagtatt ttgctaaat ttgtactgcc ttgtttatt cagatctcta cgictattac 7800
gaattacctt aatgicicaa cggaccacgc aaccticgtt caggttagtc ttiggttctt 7860
gccctatitt gctcatgicc ctgtgtigca tglcaaalga ccggcttcaa gttagtata 7920
agagtttttg ttaagigtga atgicgaagt ccaacatga ggaagaaaga tacaictatt 7980
tttagtcatt cccctttgtt tgtttgattc cataaaaata ataaacacaa agccagaacc 8040
aactattgaa tagaactatt ttctttagaa aatatacatt gtattttgag catgccatat 8100
tcttttcgat caagiatgca atataattaa acitgcatig tactacgagt ataccatgtt 8160
gttaagaatt tctttaccia caacacctig tctcgcatct tcatattttg atatccttga 8220
cattattgtt ctcttaigat tcacacaact taattatgga tttttgtgct atcaaattgt 8280
ttaggaagct ctcciaaaa ttcttgagaa cacaaaagca gatttcttta agaggattat 8340
tggtctacta aaggaatcat cagagataig ttataggga ataaaggaaa acaaatatat 8400
tacgtgtcct cacaagccag aaggatcgat gtttgtaaig gtaagctaag catagactta 8460
ctttttaagg ttaatciggg atctcagtgc atccaacaaa caatcaaalc aaaatataat 8520
tatgttttgc tatggatctt ttigaagaig catgcatitg aagaataatg aagagagtig 8580
aaattatitt aggactaac ttccatgatat calltgtcca ttttttgtt attactgtaa 8640
attggttaaca ctcaaatac attacaaaaa gtttctccc atttttagta agattgactt 8700
cctttctata accatgtatt aacttccatg taaacaggic aaactaaact tacaictttt 8760
ggaggagatc catgacgaca taaatttttg ctgcaagctc gcaaaggaag aatctgtaat 8820
tttatgtcca ggtaggaatg tatatggcca ttttaaagga aaactataig gaataataat 8880
atcttcttgi tatactaaac aatacttcc tcatcciaaa ataaatgtct tacactiagc 8940
acaattttat actagatcta gtacaaagtt gaaacagtta ttttgggaca gagggagtag 9000
tatataattgt gtgagaacat aaggttatgt ttgactgata tatgcttctt aaatgtgaaa 9060



caigtctctt tatgtttttt gatgtatatac gaagtictta tcagtittccg agatgacttac	9120
acataaaatga ttaccataatc attgtcagaa aatgtattac cacattagaa tattctttct	9180
ttttatgcaa agactagcat ggcatgtact tttccttgta cctatgtgtc tttttttttc	9240
tcgttacaatg ttgtgtcttc tcacaaaaat aataaatacca agcacatgtt ccaaatgatt	9300
attaataaatt ttgaggigt tttcaaccaa cttatatact ttcatagttc taaaaaaacc	9360
gtatataatgg ttaactctaa caaaaactta tatatgtttt ctccttaata caggagtggt	9420
tccttggaatg gaaaattggg tccgtattac ttttgccctgc gtcccatctt cttctcaaga	9480
tggtctgaa agggctcaaat cattctgtca aaggaacaag aagaagaatt ctataaatgg	9540
ttgttagttg tacacacccc tagttgtaca tctgactgaa gctgtaaaac atttctagtt	9600
atccccattt atataattca ataaaacata ttgtaatgg tctgttgtag ctgtccaagt	9660
catgtactct actttttgat gtatttggcc tcattgccct gcatcagttt caataaaaaat	9720
ggttgtgtac acaatgatga tgtagaggcg aggtgttttg accacctttt caacaaaaat	9780
ctatactttt caacaaatga aaccttgagt tccctttgag tagaagtc aaactctctt	9840
gaatatgcta tggtttccat ggtctggaatg aaacatgatg aatagaagtg aagtataatc	9900
catgtcaaaag ttttttaatg tttaatttca ttatgagaac ttgtatatta ctcttagcac	9960
acattctctg aagtaattgt cagtttggta ctgaaggga cctataattt tcctattggg	10020
gggggggggt gaataggcgg ttataacca atgtatatt ttgagaatac ttaatgttga	10080
attaaactag gtgaataatt ttccaataa aggggtcttt tattgactca caatgtacca	10140
tcaagggata caatcataat ggttacacaa tcgacatcta cataatcagg ttgcatacgg	10200
ccaacacaca cacacgcaca cacacattca cacacacaaa tcatgtctgac gaagagcgaa	10260
gtcatacaag atcaaaaacta tgcctaggcg gaggaagaat agaaaaacat gaagaaatga	10320
aaaaccgtga ctgacaacat actgaccatc gacgacaaac atctgttagac aacacaaaaa	10380
ctgcgagaaa agttctataa aactggcgcc ttcgagaagg aaacgacgtg caagagttgc	10440
catcatcgga tccaaccact aaggctatat cctgggtttt catcctgaag atcaaatccg	10500
agcaaaactcc gagtaatgtc tttaattagg taacgattca aaaaatgcc caatcatgag	10560
ttatgaccaa tttagaccaga cctaggattt ttatccaaag ctcgagacgg gtactctaga	10620
agttacatcc aattgaagtc atcccacttg cctcaataca aatagtgtca tagatgcacg	10680
gtccataatgg cgagttaatgg acatgagcgc gcatgtgtag gttaacgtga cgtgacaaga	10740
gccgtctgcc accactcgac gaagtgtttg atgggggagga agaagtatgg ctccaccaac	10800

atcccaagtt tgaaacattc tagagccctt taccatactc acaaagcgac aattgatgac 10860
tatcigtatc agacgacaaa tccaigtccg tcactcgctc tatcttggc attgacatac 10920
tacctggcaa aggcggattc aagccccaga cagcctgggc ggccgc.... 10980



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04425

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ A01H5/00, C12N5/14, C12N15/52

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A01H5/00, C12N5/14, C12N15/52

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS)

BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Soil. Sci. Plant Nutr., vol.43 [SPECIAL EDITION] (1997), pp.975-980	1-11
P,X	Plant Physiol., vol.121 [3] (1999), pp.947-956	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 October, 2000 (16.10.00)

Date of mailing of the international search report
24 October, 2000 (24.10.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



.

,

,

,

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A01H5/00, C12N5/14, C12N15/52

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A01H5/00, C12N5/14, C12N15/52

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS)
BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Soil. Sci. Plant Nutr., vol.43[SPECIAL EDITION] (1997), p.975-980	1-11
P, X	Plant Physiol., vol.121[3] (1999), P.947-956	1-11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.10.00

国際調査報告の発送日

24.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂田 誠

印

2B

9318

電話番号 03-3581-1101 内線 3235



1

2

3

4

5

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

11 January 2001 (11.01.01)

International application No.:

PCT/JP00/04425

Applicant's or agent's file reference:

JA903969

International filing date:

04 July 2000 (04.07.00)

Priority date:

05 July 1999 (05.07.99)

Applicant:

MORI, Satoshi et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

01 December 2000 (01.12.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

REC'D 11 AUG 2001

WIPO PCT

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 JA903969	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JPO0/04425	国際出願日 (日.月.年) 04.07.00	優先日 (日.月.年) 05.07.99	
国際特許分類(IPC) Int. Cl ⁷ A01H5/00, C12N5/14, C12N15/52			
出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団			

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

☒ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で 1 ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I ☒ 国際予備審査報告の基礎

II ☐ 優先権

III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

IV ☐ 発明の単一性の欠如

V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明

VI ☐ ある種の引用文献

VII ☐ 国際出願の不備

VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日
01.12.00

国際予備審査報告を作成した日
06.08.01

名称及びあて先
日本国特許庁(IPEA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

2B 9318

坂田 誠

電話番号 03-3581-1101 内線 3237

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-24 ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 2, 3, 6, 8-11 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 1, 5, 7 項、 14, 05, 01 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 図面 第 1-24 ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☒ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☒ 請求の範囲 第 4 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-3, 5-11

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

1-3, 5-11

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-3, 5-11

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-11

国際調査報告で引用した文献1 {Soil. Sci. Plant Nutr., vol.43[SPECIAL EDITI ON](1997), p.975-980} には、オオムギにおいて鉄欠乏により誘導されるムギネ酸類 生合成経路中の酵素であるニコチアナアミンアミノ基転移酵素(NAAT)をコード する遺伝子naatのcDNAをクローニングした旨記載されており、これに基づい て対応するゲノム遺伝子を単離することに格別の困難は認められない。そして、上記 文献1(特にIntroduction参照)にはムギネ酸類整合性経路の遺伝子を植物に導入す ることで、鉄欠乏耐性植物を作出することが示唆されているので、上記の遺伝子を適 宜のプロモータとともにイネ科植物に導入し、鉄欠乏耐性植物を作出することは、当 業者が容易に想到し得ることと認められる。

請 求 の 範 囲

1. (補正後) イネ科植物にムギネ酸類生合成経路中の酵素をコードするゲノム遺伝子を導入して、鉄吸収性が改善されたイネ科植物を作出する方法。
2. 酵素がニコチアナミンアミノ基転移酵素 (N A A T) であり、それをコードする遺伝子が *n a a t* である請求の範囲第 1 項に記載の方法。
3. プロモーターが C a M V 3 5 S である請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載の方法。
4. (削除)
5. ^(補正後)ゲノムがオオムギのゲノム *n a a t* である請求の範囲第 1 項に記載の方法。
6. 遺伝子の塩基配列が、配列表の配列番号 1 で示される塩基配列、若しくは当該塩基配列にストレージメントな条件でハイブリダイズ可能でかつニコチアナミンアミノ基転移酵素 (N A A T) 活性を有する蛋白質を発現し得る塩基配列、又はそれらに相補的な塩基配列である請求の範囲第 5 項に記載の方法。
7. ^(補正後)請求の範囲第 1 項～第 3 項または第 5 項～第 6 項のいずれかに記載の方法で製造され得る鉄欠乏耐性を有するイネ科植物。
8. 請求の範囲第 7 項に記載のイネ科植物の種子。
9. 請求の範囲第 7 項に記載のイネ科植物の細胞。
10. 請求の範囲第 7 項に記載のイネ科植物を鉄欠乏耕地で育成する方法。
11. 請求の範囲第 10 項に記載の方法により得られたイネ科植物の作物。

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 JA903969	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/04425	国際出願日 (日.月.年) 04.07.00	優先日 (日.月.年) 05.07.1999
出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☒ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 4 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☒ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ A01H5/00, C12N5/14, C12N15/52

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ A01H5/00, C12N5/14, C12N15/52

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS)
BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Soil. Sci. Plant Nutr., vol. 43[SPECIAL EDITION] (1997), p. 975-980	1-11
P, X	Plant Physiol., vol. 121[3] (1999), P. 947-956	1-11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.10.00

国際調査報告の発送日

24.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂田 誠

2B

9318

電話番号 03-3581-1101 内線 3235

